



**You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną oraz innych instrumentalnych technik analitycznych do badania reakcji oscylacyjnych wybranych pochodnych kwasu octowego i kwasu propionowego

Author: Monika Gontarska

Citation style: Gontarska Monika. (2011). Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną oraz innych instrumentalnych technik analitycznych do badania reakcji oscylacyjnych wybranych pochodnych kwasu octowego i kwasu propionowego. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Monika Gontarska

**Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej
z detekcją densytometryczną
oraz innych instrumentalnych technik analitycznych
do badania reakcji oscylacyjnych
wybranych pochodnych kwasu octowego i kwasu propionowego**

Promotor pracy

Prof. dr hab. Teresa Kowalska

Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski

Katowice

2011

Składam serdeczne podziękowania

Pani Profesor dr hab. Teresie Kowalskiej za cierpliwość, wyrozumiałość, poświęcony czas i pomoc oraz bardzo cenne uwagi podczas wykonywania pracy

Panu Doktorowi Mieczysławowi Sajewiczowi za twórczą i rzeczową współpracę oraz pomoc udzieloną w czasie wykonywania badań

Europejskiemu Funduszowi Społecznemu za wsparcie finansowe w postaci stypendium projektu "Uniwersytet Partnerem Gospodarki Opartej na Wiedzy" przyznawanego mi w latach 2008-2011

Dla Aleksandra.

Dla Tomasza.

Dla Mamy.

Dziękuję.

Spis treści

	str.
1. Wstęp	7
2. Inwersja chiralna profenów	8
2.1. Transenancjomeryzacja <i>in vivo</i>	12
2.1.1. Ketoprofen	19
2.1.2. Flurbiprofen	21
2.2. Oscylacyjna inwersja chiralna w układach abiotycznych	23
3. Znaczenie α -fenyloglicyny i kwasu migdałowego w procesach fizjologicznych	29
3.1. α -Fenyloglicyna	30
3.2. Kwas migdałowy	33
4. Zastosowanie technik chromatograficznych do badania przemian strukturalnych w związkach chiralnych	39
4.1. Istota chromatografii dynamicznej	39
4.2. Dynamiczna wysokosprawna chromatografia cieczowa	42
4.3. Dynamiczna chromatografia gazowa	45
5. Brukselator – wybrany model chemicznych reakcji oscylacyjnych	48
5.1. Brukselator z homogenicznym rozkładem reagentów	50
5.2. Brukselator z dyfuzją	52
6. Cel pracy	57
7. Część doświadczalna	58
7.1. Odczynniki i materiały	58
7.2. Sprzęt i aparatura	60
7.3. Metodyka prowadzonych badań	62
7.3.1. Technika chromatografii cienkowarstwowej (TLC)	62
7.3.2. Technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją na matrycy fotodiodowej (HPLC-DAD)	66
7.3.3. Technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej ze spektrometrią masową (HPLC-MS)	67
7.3.4. Technika spektroskopii ^{13}C NMR	68
7.3.5. Pomiary polarymetryczne	68
7.3.6. Pomiary mikroskopowe	70
7.3.7. Reakcja biuretowa	70

7.3.8. Test mikrobiologiczny	71
7.4. Wyniki badań i ich omówienie	72
7.4.1. Zjawisko oscylacyjnej inwersji chiralnej oraz oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) <i>S</i> -(+)-flurbiprofenu i <i>R</i> -(-)-flurbiprofenu	72
7.4.1.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa	72
7.4.1.2. Polarymetria	77
7.4.2. Samorzutna peptyzacja <i>in vitro</i> α -fenyloglicyny w środowisku wodnym	82
7.4.2.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa	82
7.4.2.2. Test biuretowy	87
7.4.2.3. Polarymetria	88
7.4.2.4. Test mikrobiologiczny	92
7.4.2.5. Achiralna wysokosprawna chromatografia cieczowa	93
7.4.3. Oscylacyjna inwersja chiralna i oscylacyjna polikondensacja kwasu migdałowego <i>in vitro</i> w środowisku wodnym	109
7.4.3.1. Achiralna chromatografia cienkowarstwowa	109
7.4.3.2. Polarymetria	117
7.4.3.3. Spektroskopia węglowego magnetycznego rezonansu jądrowego (^{13}C NMR)	123
7.4.3.4. Achiralna wysokosprawna chromatografia cieczowa	125
7.4.4. Oscylacyjna inwersja chiralna i oscylacyjna polikondensacja ketoprofenu	133
7.4.4.1. Chromatografia cienkowarstwowa	133
7.4.4.2. Polarymetria	147
7.4.4.3. Spektroskopia węglowego magnetycznego rezonansu jądrowego (^{13}C NMR)	152
7.4.4.4. Achiralna wysokosprawna chromatografia cieczowa	155
7.5. Modelowanie procesów oscylacyjnej inwersji chiralnej i oscylacyjnej kondensacji dla alifatycznych niskocząsteczkowych kwasów karboksylowych – model dwóch sprzężonych Templatorów	165
7.5.1. Model z uwzględnieniem dimerów asocjacyjnych poprzez wiązania wodorowe bez członu dyfuzyjnego	165
7.5.2. Model z uwzględnieniem dimerów asocjacyjnych poprzez wiązania wodorowe z jednowymiarowym członem dyfuzyjnym	172
7.5.3. Model z uwzględnieniem dimerów asocjacyjnych poprzez wiązania wodorowe z dwuwymiarowym członem dyfuzyjnym	174

7.5.4. Model z uwzględnieniem dimerów i multimetrów asocjacyjne poprzez wiązania wodorowe	176
7.5.5. Model I z uwzględnieniem kondensacji	179
7.5.6. Model z uwzględnieniem asocjacji poprzez wiązania wodorowe i kondensacji	180
7.5.7. Model II z uwzględnieniem kondensacji	183
7.5.8. Model III z uwzględnieniem kondensacji	184
7.6. Wnioski	187
8. Streszczenie	188
9. Literatura	190
10. Życiorys	201
11. Lista prac własnych tematycznie związana z rozprawą doktorską	202
12. Lista publikacji konferencyjnych tematycznie związana z rozprawą doktorską	204

1. Wstęp

Reakcje oscylacyjne to swoista rzadkość wśród reakcji chemicznych. Przedmiot niniejszych badań zarysował się podczas opracowywania metod chromatograficznego rozdzielania par enancjomerów ibuprofenu i naproksenu, należących do grupy niesteroidowych leków o właściwościach przeciwzapalnych i przeciwgorączkowych (ang. non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs). Ustalono wówczas, iż związki te nie są stabilne podczas przechowywania ich jako optycznie czystych enancjomerów, rozpuszczonych w prostych, niskocząsteczkowych rozpuszczalnikach. Niestabilność ta jest związana z oscylacyjną zmianą stężenia pierwotnie rozpuszczonego enancjomeru badanego związku, który z czasem przechodzi w swój własny antymer.

Profeny jako leki przeciwbólowe są dziś ogromnie popularne i ogólnodostępne. Również wiele innych niskocząsteczkowych chiralnych kwasów karboksylowych jest stosowanych jako substancje lecznicze, lub jako ich prekursory. W związku z tym nasuwa się refleksja o prawdopodobnej powszechności opisaney wyżej labilności sterycznej i o jej znaczeniu dla biochemii i farmakologii.

W ramach niniejszych badań postanowiłam sprawdzić, czy zjawisko inwersji chiralnej dotyczy innych, niż ibuprofen i naproksen, związków z grupy profenów, tj. ketoprofenu i flurbiprofenu. Jednocześnie wytypowałam do badań dwie pochodne kwasu octowego (α -fenyloglicynę i kwas migdałowy), odgrywające znaczącą rolę w medycynie i kosmetologii, celem znalezienia odpowiedzi na pytanie, czy wspomniana wyżej niestabilność steryczna jest zależna od długości łańcucha węglowego. Ponadto wydawało się, iż ze względów energetycznych reakcja inwersji chiralnej nie może być jedynym krokiem elementarnym rozpatrywanego procesu. Poglębione badania doświadczalne, między innymi z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczonej, wykazały, że oscylacyjnej inwersji chiralnej rozpatrywanych związków wyjściowych towarzyszy ich oscylacyjna polikondensacja.

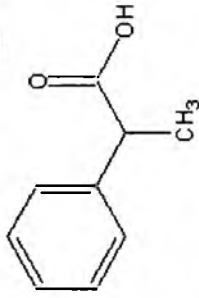
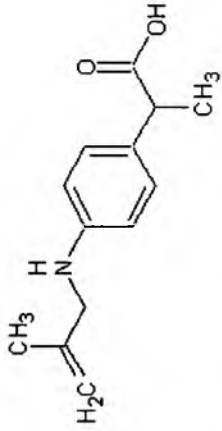
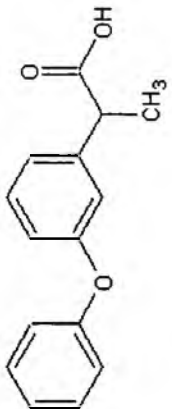
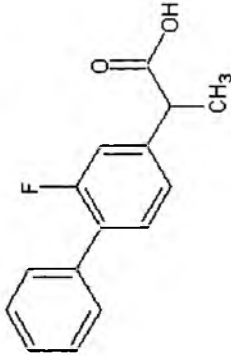
Reasumując, w niniejszej pracy wykorzystałam wybrane techniki chromatografii cienkowarstwowej, wysokosprawnej chromatografii cieczonej, polarymetrii oraz dodatkowe techniki analityczne celem uzyskania możliwie jak najszerszego wyobrażenia o sumie procesów jednostkowych zachodzących podczas przechowywania chiralnych niskocząsteczkowych kwasów karboksylowych z grup profenów, aminokwasów i hydroksykwasów w abiotycznych roztworach wodnych i niewodnych.

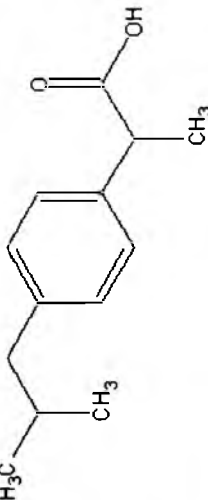
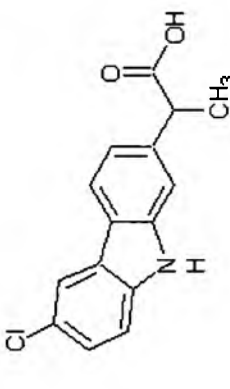
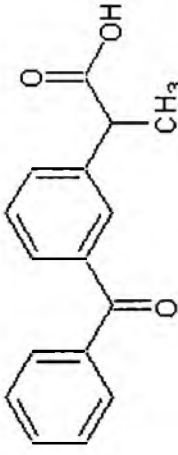
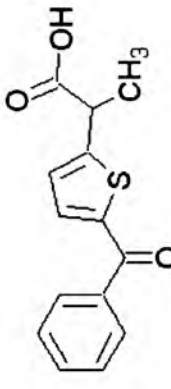
2. Inwersja chiralna profenów

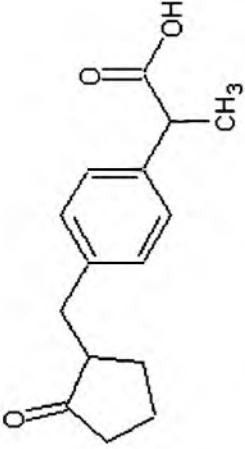
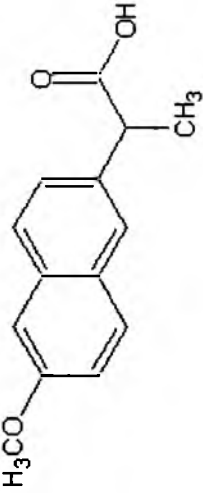
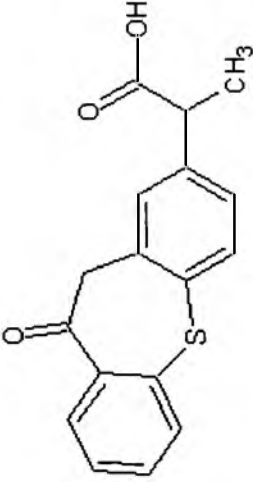
Profeny to kwasy 2-arylopropionowe (ang. 2-arylpropionic acids, 2-APAs), należące do niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), szerokiej i niejednorodnej grupy leków o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbólowym i przeciwgorączkowym [1]. Z powodu obecności w strukturze profenów asymetrycznego atomu węgla, występują one w postaci dwóch optycznie czynnych enancjomerów [2]. Najprostszym przedstawicielem grupy profenów jest kwas 2-fenylpropionowy, który jednak nie posiada właściwości leczniczych w żadnej z form czynnych optycznie. W Tabeli 1 zostały przedstawione wybrane profeny wraz z ich strukturami. Na rynku farmaceutycznym są one dostępne głównie w formie racematu, jedynie naproksen od samego początku jest sprzedawany w formie enancjomeru S. Uważa się, że działanie terapeutyczne wykazują jedynie enancjomery o konfiguracji S, natomiast ich antymery R są praktycznie obojętne dla organizmu. Z tego powodu coraz więcej profenów zaczyna się sprzedawać w formie S [3]. Wykazano natomiast, iż pod wpływem różnorodnych czynników, działających *in vivo*, a także *in vitro*, może zachodzić zmiana struktury przestrzennej profenów z izomeru R do formy S i odwrotnie, czyli inwersja chiralna.

Zrozumienie znaczenia konformacyjnej stabilności leków chiralnych może być niezwykle pomocne przy interpretacji danych otrzymanych z badań farmaceutycznych, farmakokinetycznych, czy też farmakodynamicznych. Ocena względnej wartości marketingowej racematu czy też czystego enancjomeru jest wieloczynnikowa. W szczególności zależy ona od znaczenia i wielkości korzyści terapeutycznych i finansowych, a dodatkowo musi być ustalona dla każdej substancji leczniczej z osobna. Dlatego tak ważną rolę odgrywają w takich przypadkach badania nad inwersją chiralną leków racemicznych. Przy produkcji stereochemicznie czystych związków i racematów, inwersja chiralna musi być brana pod uwagę jako kwestia rozstrzygająca i jest to wystarczającym uzasadnieniem dla szczegółowego rozważania inwersji na każdym z etapów, szczególnie przy produkcji i ocenie bezpieczeństwa stosowania leków [5].

Tabela 1. Wybrane profeny, ich nazewnictwo, struktury oraz zastosowanie w lecznictwie [3,4].

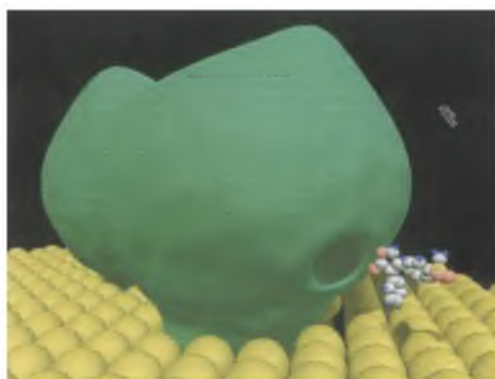
Nazwa zwyczajowa	Nazwa systematyczna	Nazwy wybranych preparatów rynkowych	Właściwości lecznicze	Struktura
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Kwas 2-fenylpropanowy	Kwas 2-fenylpropanowy	brak	brak	
Alminoprofen	Kwas 2-[4-(2-metyloprop-2-enyloamino)fenylo]propanowy	Minalfene	Zalecany w reumatoidalnym zapaleniu stawów, zesztywniającym zapaleniu stawów kręgosłupa, w pourazowych bólach i zapaleniach stawów oraz tkanek miękkich, w rwie kulszowej, nerwobólach, zapaleniu wielonarwowym, kręczy szyi, zapaleniu gardła i ucha środkowego, w przeziębieniu i do łagodzenia objawów chorób zakaźnych	
Fenoprofen	Kwas 2-[3-(fenoksy)fenylo]propanowy	Expron Fenopron Fepron Feprona Nalfon	Wartościowy w leczeniu chorób przeziębieniowych, zaburzeń mięśni szkieletowych, stawów i tkanek okołokostnych oraz bólów różnego pochodzenia.	
Flurbiprofen	Kwas 2-[3-fluoro-4-fenylo]fenylo]propanowy	Ansaid Flugalin Inflaflur Ocufen Strepsils Intensive Tantum Activ Gola	Działa silnie przeciwzapalnie, przeciwegregacyjnie, przeciwgorączkowo i przeciwbólowo. Zapobiega zwięzieniu żrenicy oka podczas operacji okulistycznych. Może być stosowany w leczeniu chorób przeziębieniowych, chorób reumatycznych, stanów zapalnych mięśni, ścięgien, tkanki podskórnej.	

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Ibuprofen	Kwas 2-(4-izobutylofenylo)propanowy	Bolinet Brufen Ibuten Ibum Ibuprom Nurofen Ibalgin	Działa przeciwbólowo, przeciwzapalnie, przeciwgorączkowo, przeciwreumatycznie. Zapobiega zlepianiu krwinek, wydłuża czas krwawienia. Stosowany w leczeniu chorób przebiegniowych, objawów chorób zakaźnych, w leczeniu chorób reumatycznych i bólów różnego pochodzenia.	
Kaprofen	Kwas 2-(6-chloro-9H-dibenzopirrol-2-ilo)propanowy	Carprodyl (produkt leczniczy weterynaryjny)	Stosowany w łagodzeniu stanów zapalnych i bólu w chorobach układu mięśniowo-szkieletowego i chorobach zwyrodnieniowych stawów oraz do łagodzenia bólu pooperacyjnego po zabiegach.	
Ketoprofen	Kwas 2-(3-benzoilofenylo)propanowy	Bi-Profenid Fastum Ketonal Ketoprofen Ketopronil Ketospray Profenid Ketoprom	Działa silnie przeciwzapalnie, przeciwbólowo, przeciwgorączkowo. Stosowany w leczeniu objawowym zmian zapalnych i zwyrodnieniowych w schorzeniach reumatycznych, czasem stosowany w łagodzeniu niektórych zespołów bólowych.	
Kwas tiaprofenowy	Kwas 2-(5-benzoilofenylo)propanowy	Anafen Flanid Gasam Lindolab Suralgam Surdolin Surgamyl	Działa przeciwbólowo, przeciwwysiękowo, przeciwbólowo, przeciwzapalnie i przeciwgorączkowo. Zalecany w zwalczaniu bólów pourazowych, reumatycznych, artretycznych, pozabiegowych. Skuteczny w postrzale, kręczy szyi, w bólach zębów, w bólach przy zapaleniu żył i bólach połamaniowych.	

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Loksoprofen	Kwas 2-{4-[(2-oksocyklopentylo)metylo]fenylo}propanowy	Lobu Loxonin Oxeno	Zalecany przy gorączce, zapaleniu, zaburzeniach mięśni szkieletowych i stawów oraz bólu.	
Naproksen	Kwas 2-(6-metoksy-2-naftylo)propanowy	Aleve Anapran Apo-Naproxen Apranax Naproxen Natrax Pabi-Naproxen NAXII	Wywiera działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe, przeciwartretyczne, przeciwreumatyczne, przeciwgorączkowe i przeciwwagacyjne. Zalecany w leczeniu chorób reumatycznych i skazy artretycznej. Znosi bóle stawów i kości oraz bóle pourazowe (np. kontuzje sportowe).	
Zaltoprofen	Kwas 2-[10,11-dihydro-10-oksodibenzeno(b,f)tiopin-2-ylo]propanowy	Soleton	Pomocny przy zapaleniach, bólach oraz zaburzeniach mięśni szkieletowych, stawów i tkanek okołostawowych.	

2.1. Transenancjomeryzacja *in vivo*

Aktywność terapeutyczna profenów polega na hamowaniu działania cyklooksygenazy, kluczowego enzymu w biosyntezie prostaglandyn (grupy hormonów, pochodnych kwasu arachidonowego, będących regulatorami procesów fizjologicznych) (Rys. 1). Enzym ten występuje w postaci dwóch form izomerycznych, a mianowicie COX-1 i COX-2. Pierwszy z nich odpowiada za syntezę prostaglandyn chroniących błonę wyścielającą żołądek, zmniejszając wytwarzanie kwasu żołądkowego i regulując wydzielanie śluzu oraz prawidłowe ukrwienie żołądka, natomiast enzym COX-2 uczestniczy w procesach zapalnych i przyczynia się do powstawania bólu, gorączki i obrzęków. Przewaga profenów nad salicylanami (np. nad aspiryną), które również należą do NLPZ, polega na hamowaniu działania jedynie formy COX-2, a nie obu odmian tego enzymu, co częściowo eliminuje efekty uboczne w postaci podrażnienia ścian żołądka [7,8].

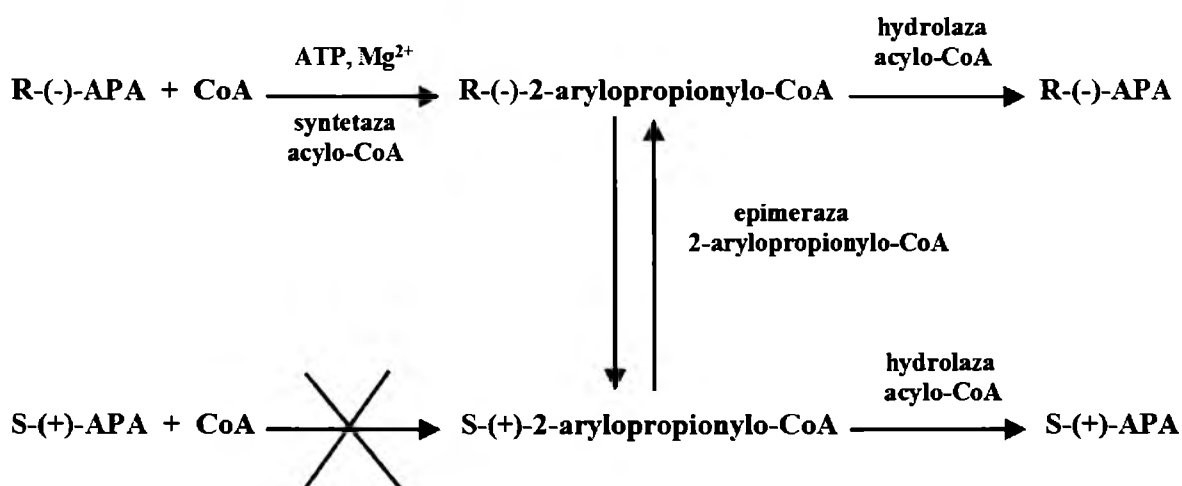


Rys. 1. Częsteczka inhibitora cyklooksygenazy-2 (COX-2) zbliżająca się do kanału z miejscem aktywnym enzymu [6].

Bardzo ważną ścieżką w metabolizmie kwasów 2-arylopropionowych jest inwersja chiralna, podczas której nieaktywny w stosunku do cyklooksygenazy enancjomer R jest przekształcany w swój własny antymer, aktywny wobec cyklooksygenazy. Częsteczkowy mechanizm tego procesu składa się z trzech kroków elementarnych [8,9]:

- I. Stereoselektywna aktywacja *R*-(-)-2-APA przez tworzenie się wiązania tioestrowego między grupami tiolową koenzymu A (CoA) i karboksylową profenu w obecności ATP, jako niezbędnego źródła energii, oraz Mg^{2+} . Aktywacja ta jest katalizowana przez syntetazę acylo-CoA.
- II. Enzymatyczna epimeryzacja tioestru z konfiguracji *R* do *S*.
- III. Hydroliza tioestru do wolnego, aktywnego *S*-(+)-2-APA.

Schematycznie mechanizm ten został przedstawiony na Rys. 2.



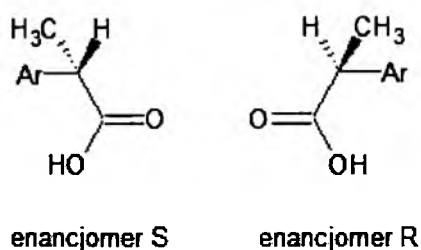
Rys. 2. Mechanizm inwersji chiralnej profenów zachodzącej *in vivo* [9].

Szybkość inwersji chiralnej profenów zależy od substratów i również od tego organu, w którym ta inwersja zachodzi. Najczęściej i najszybciej zachodzi ona w wątrobie [10]. Transenancjomeryzacja zachodzi także w jelitach, nerkach, płucach, mięśniach, mózgu i tłuszczu [11,12].

Ciekawe jest to, iż inwersja chiralna jest przyczyną występowania skutków ubocznych przy leczniczym stosowaniu profenów. Powstały tioester może negatywnie działać na metabolizm lipidów, hamować β -oksydację mitochondrialną kwasów tłuszczowych wywołując stłuszczenie wątroby, zmieniać się w triglicerydy uszkadzając błony komórkowe oraz zmieniać poziom lipidów we krwi [2,13,14]. W konsekwencji na szybkość inwersji chiralnej mogą mieć wpływ te związki, które oddziałują na wewnątrzkomórkowe stężenie koenzymu A [12].

Dlaczego tylko enancjomer R, a nie jego antymer, ulega inwersji chiralnej? Wspólną strukturalną właściwością profenów jest tetraedryczna hybrydyzacja chiralnego atomu węgla, do którego przyłączony jest łańcuch zawierający grupę aryłową (Rys. 3). Stereospecyficzność może być zaobserwowana w procesach farmakokinetycznych, w których wykorzystywany jest nośnik białkowy, czyli receptor lub enzym. Dodatkowo występują różne stosunki ilościowe lub jakościowe ze względu na stereoselektywność procesów farmakodynamicznych. Mechanizm inwersji sugeruje, że enancjomer R może być aktywowany przez przekształcenie go w adenylan (sól kwasu adenozymonofosforowego) do dalszej reakcji z koenzymem A, podczas gdy adenylan powstały z S-(+)-profenu nie jest

zdolny do takiej reakcji [15]. Co ciekawe, hamowanie syntezy prostaglandyn przeprowadzane *in vitro* pokazuje, iż aktywność w tym względzie wykazuje tylko enancjomer S. Jednak ta stereoselektywność działania nie występuje *in vivo* z powodu jednokierunkowej metabolicznej inwersji chiralnego centrum asymetrii z nieaktywnego izomeru R do jego antymeru S [16]. Farmakokinetyka absorpcji, dystrybucji, metabolizmu, łączenia się z białkiem, czy eliminacji może być różna dla każdego z enancjomerów, szczególnie wówczas gdy dodatkowo weźmie się pod uwagę indywidualne cechy każdego organizmu żywego oraz toksyczność leków [17]. Kiedy inwersja chiralna nie jest obserwowana, zakłada się, iż po prostu nie zachodzi lub, że poprzedza ją eliminacja leku tak, jak to się dzieje w przypadku kwasu tiaprofenowego [18].



Rys. 3. Ogólny wzór enancjomerów profenów, gdzie Ar oznacza grupę arylową.

Ze względu na zasięg i kierunki zachodzenia inwersji chiralnej, profeny można podzielić na pięć grup [9]:

- I. Profeny ulegające jednokierunkowej inwersji chiralnej.
- II. Profeny ulegające jednokierunkowej inwersji chiralnej lub nieulegające jej w ogóle.
- III. Profeny ulegające jednokierunkowej inwersji chiralnej lub dwukierunkowej inwersji chiralnej lub nieulegające jej w ogóle.
- IV. Profeny ulegające dwukierunkowej inwersji chiralnej lub nieulegające jej w ogóle.
- V. Profeny nieulegające inwersji chiralnej.

Grupę I reprezentują m.in. ibuprofen, fenoprofen, benaksoprofen, flunaksoprofen, pranoprofen i indoprofen. Ibuprofen jest najlepiej przebadanym związkiem spośród tej grupy profenów [19-31]. To klasyczny przykład leku, w przypadku którego stereochemia jest istotna dla zrozumienia jego biologicznych właściwości, gdyż wykazuje on wyraźną stereoselektywność w swojej farmakokinytyce. Analiza składu stereochemicznego metabolitów ibuprofenu w ludzkim moczu wskazuje na *S*-ibuprofen jako na główny substrat

wyjściowy. To oznacza, iż około 70% podanej dawki *R*-ibuprofenu ulega inwersji chiralnej [30].

Choć większość zalet chiralnych NLPZ przypisuje się enantiomerowi *S*, uznając jego antymer *R* za bezużyteczny i potencjalnie szkodliwy, w przypadku ibuprofenu izomer *R* odgrywa rolę proleku dzięki temu, że ulega on inwersji do izomeru *S*. Jednak uważa się, iż sprzedaż stereochemicznie czystego *S*-NPLZ pozwoli uniknąć prawdopodobnie negatywnych efektów przy podawaniu teoretycznie obojętnego antymeru *R* [16]. Co ciekawe, w przypadku ibuprofenu niektórzy badacze zalecają sprzedaż stereochemicznie czystego enantiomeru *R*, który ma być prawdopodobnie bezpieczniejszy, niż racemat [32].

Dane kliniczne potwierdzają, że *S*-ibuprofen jednakowo hamuje aktywność COX-1 i COX-2, zaś antymer *R* wykazuje mniejszą zdolność do hamowania COX-1, a zupełny brak aktywności w stosunku do COX-2, natomiast *R*-ibuprofenylo-CoA w większym stopniu hamuje działanie COX-2, niż COX-1. W przypadku obniżenia temperatury, do którego dochodzi w mózgu, *R*-ibuprofenylo-CoA łatwiej niż *S*-ibuprofen przechodzi przez barierę krew-mózg, fizyczną i biochemiczną barierę pomiędzy naczyniami krwionośnymi a tkanką nerwową, mającą zabezpieczać układ nerwowy przed szkodliwymi czynnikami, a także umożliwić selektywny transport substancji z krwi do płynu mózgowo-rdzeniowego. Tam właśnie *R*-ibuprofenylo-CoA może zostać poddany trzeciemu etapowi inwersji. W ten sposób *R*-ibuprofen może mieć swój wkład w działanie przeciwgorączkowe i przeciwzapalne podanego racematu, nawet jeśli sam wydaje się być obojętny dla organizmu [25,26]. *S*-Ibuprofen wykazuje znacznie wyższą rozpuszczalność, niższą temperaturę topnienia, większą szybkość rozpuszczania i inną strukturę krystalograficzną niż racemat, a zatem częściej uważa się, iż to preparaty z *S*-ibuprofenem mogą lepiej się wchłaniać i być korzystniejsze fizjologicznie, co wpływa na skrócenie czasu aktywacji działania terapeutycznego [20]. Tym samym chętniej zaleca się sprzedaż enantiomeru *S*, niż jego antymeru *R*, czy też racematu.

Fenoprofen ulega jednokierunkowej inwersji chiralnej *in vivo*, podczas której nieaktywny enantiomer *R* przekształca się w swój aktywny antymer *S*. Pod tym względem profen ten został przebadany w takich organizmach żywych, jak szczury, świnki morskie, koty, konie, owce, psy, a oprócz tego i ludzie [10-12,33-39]. Odkryto, iż występuje znaczna międzygatunkowa zmienność, jeśli chodzi o wydajność tej inwersji w związku z zasięgiem działania syntetazy acylo-CoA. W przypadku fenoprofenu trzyetapowy mechanizm inwersji zachodzi w mózgu prowadząc do mniej wydajnej reakcji, niż gdyby inwersja zachodziła w wątrobie.

R-Benoksaprofen ulega jednokierunkowej inwersji do swojego antymeru *S*, co zostało zaobserwowane u szczurów i u ludzi, choć u tych pierwszych zachodzi z dużo większą szybkością. Dodatkowo w przypadku szczurów inwersja chiralna benoksaprofenu pozornie nie zachodzi w wątrobie, ale badania *in vitro* sugerują, że przemiana dzieje się w momencie przechodzenia leku przez ściany jelit do krwioobiegu [40,41]. Bardzo zbliżony strukturalnie do benoksaprofenu flunoksaprofen wykazuje podobieństwo w zachowaniu u szczurów, królików i ludzi. Jednak ilość usuwanego z organizmu enancjomeru *R* jest o wiele większa, niż ilość enancjomeru *S*. Stosunek antymeru *R* do antymeru *S* flunoksaprofenu badany u szczurów po inwersji chiralnej wynosi 0,54 [42,43]. Benoksaprofen i flunoksaprofen zostały wycofane ze sprzedaży z powodu swojej hepato- i nefro-toksyczności [9,44].

Pranaprofen oraz indoprofen, podobnie jak wcześniej wymienione profeny, ulegają jednokierunkowej inwersji chiralnej, podczas której enancjomer *R* przekształca się w swój antymer *S*. W przypadku pranaprofenu proces ten został zaobserwowany w nerkach myszy, co dodatkowo zostało potwierdzone badaniami *in vitro* [45]. Indoprofen pod tym względem został przebadany *in vitro* z użyciem szczurzych enzymów wątrobowych [46]. Również indoprofen został wycofany ze sprzedaży z powodu swojej hepato- i nefro-toksyczności [9,44].

Grupę II, w której profeny mogą ulegać inwersji chiralnej, gdzie enancjomer *R* może przekształcać się w swój antymer *S*, lub nie ulegać jej wcale, reprezentują flurbiprofen (omówiony szczegółowo w Rozdz. 2.1.2), suprofen oraz naproksen.

Tylko 7% podanej dawki *R*-suprofenu jest inwertowane w organizmie ludzkim do jego izomeru *S*, natomiast u kotów nie obserwuje się inwersji chiralnej tego związku [47,48]. Z badań przeprowadzonych nad fenoprofenem wynika, że u kotów zachodzi inwersja chiralna w takim samym stopniu, jak u psów [35,36], zatem brak inwersji suprofenu nie jest spowodowany specyfiką metaboliczną tego gatunku. Wyniki badań mogą sugerować, że suprofen nie jest substratem w reakcji z użyciem syntetazy acylo-CoA, a tworzenie *R*-suprofenylo-CoA w etapie przejściowym podczas inwersji nie ma miejsca. Suprofen został wycofany ze sprzedaży z powodu swojej hepato- i nefro-toksyczności [9,44].

Głębokie różnicowanie międzygatunkowe obserwuje się również w przypadku inwersji chiralnej naproksenu. Enancjoselektywny metabolizm tego związku był badany *in vitro* przy pomocy enzymów wątrobowych ludzi, małp makaków oraz królików. Stereoselektywna glukoronidacja (jeden z etapów metabolizmu ksenobiotyków w obecności enzymów wątrobowych) *S*-naproksenu u ludzi jest hamowana obecnością *R*-naproksenu i na odwrót [49]. W przypadku szczurów ilość usuwanego z organizmu enancjomeru *R* jest o wiele

większa, niż ilość enancjomeru S, a stosunek antymeru R do antymeru S naproksenu badany po inwersji wynosi 0,02 [42,43].

Jak do tej pory, jedynym reprezentantem grupy III wydaje się być ketoprofen (omówiony szczegółowo w Rozdz. 2.1.1), który charakteryzuje się tym, iż może ulegać inwersji chiralnej w jednym lub obu kierunkach, a także nie ulegać jej wcale.

Kwas tiaprofenowy oraz nie wykazujący właściwości leczniczych kwas 2-fenylopropionowy należą do grupy, w której występuje dwukierunkowa inwersja chiralna lub nie występuje ona w ogóle, czyli do grupy IV.

Dwukierunkowość inwersji chiralnej kwasu tiaprofenowego odkryto, gdy podano szczurom jego enancjomer R, jednakże preferowany w tym procesie był kierunek od antymeru R do S. Zostało to również zaobserwowane *in vitro*, kiedy to mieszano enancjomery kwasu tiaprofenowego z rozdrobnioną szczurzą wątrobą. Stwierdzono wtedy także, iż inwersja chiralna tego profenu może mieć inny szlak metaboliczny, niż w przypadku pozostałych APA, jak na przykład ibuprofen [50]. W przeciwieństwie do innych profenów, enancjomery kwasu tiaprofenowego nie ulegają inwersji chiralnej u ludzi, a jeśli nawet taka inwersja zachodzi, to znacznie wyprzedza ją eliminacja tego związku z organizmu. Zostało to potwierdzone podczas podawania czystych enancjomerów zdrowym ochotnikom [51]. Kwas ten wyróżnia się inną farmakokinetyką, niż pozostałe APA, choć nie obserwuje się odmiennego zachowania tego związku u szczurów [18,52].

Inwersja chiralna kwasu 2-fenylopropionowego przebiega powoli, acz znacząco w wątrobie szczurów. Nerki wykazują nawet trzykrotnie większą szybkość enancjomeryzacji względem antymeru R niż wątroba, natomiast proces odwrotny również w nerkach zachodził powoli. Wątroba i nerki są uważane za główne organy, w których ma miejsce inwersja chiralna enancjomerów kwasu 2-fenylopropionowego, w jelicie cienkim proces ten jest niezwykle powolny, natomiast inne tkanki są zupełnie nieaktywne [52,53]. Dwukierunkowa inwersja antymerów tego kwasu została zaobserwowana u psów, natomiast organizm myszy wydaje się być kompletnie nieaktywny wobec tego procesu [52,54].

Grupę V, czyli grupę profenów nie ulegających inwersji chiralnej, reprezentują pirprofen oraz karprofen.

Badania na szczurach nie wykazały żadnych znaczących różnic przed i po podaniu w ilościowym stosunku R-pirprofenu do S-pirprofenu. Eksperyment przeprowadzony *in vitro* z użyciem szczurzego jelita czczego potwierdza, iż inwersja chiralna pirprofenu nie zachodzi. Lek ten był sprzedawany w formie racematu do czasu wycofania go z powodu kilku doniesień o jego szkodliwości względem wątroby [55].

Karprofen, jak wynika z literatury, nie ulega chiralnej inwersji u żadnego z przebadanych zwierząt (psy, konie, szczury, świnie, owce i bydło), podobnie u ludzi [42,56-58]. W tym przypadku również potwierdza się twierdzenie, iż to enancjomer S posiada właściwości terapeutyczne. Ukazuje się to podczas eliminacji leku z organizmu. U szczurów ilość usuwanego *R*-karprofenu w czystej formie jest znacząco wyższa, niż ilość jego czystego enancjomeru S. Oznacza to, iż właśnie *S*-karprofen jest chętniej metabolizowany [42,57].

Z powyższego przeglądu literaturowego wynika, iż istnieje ogromna różnorodność międzygatunkowa w procesie inwersji chiralnej profenów. Te różnice wskazują na dwie ważne kwestie. Pierwsza to wybór gatunku zwierzęcia, które zostanie użyte w badaniach. Oczywiście najbardziej odpowiednie będzie takie zwierzę, które ma profil krwi najbardziej zbliżony do ludzkiego. Druga kwestia dotyczy stosowania leków w terapii zwierząt, głównie chodzi tu o bydło i o świnie. W takim przypadku musi być zachowana równowaga między wymaganymi korzyściami terapeutycznymi zastosowanego *S*-profenu u zwierzęcia, a tworzeniem się szkodliwych pochodnych podczas inwersji chiralnej *R*-profenu, które mogą zlokalizować się w mleku lub mięsie [9,56].

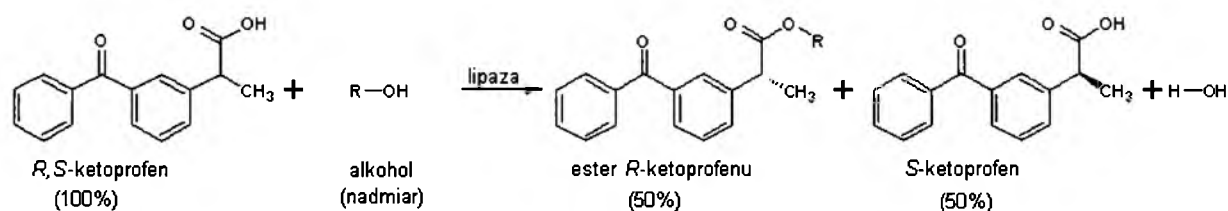
Dodatkową istotną informacją jest to, że istnieje związek między strukturą danej substancji a jej inwersją. Mianowicie wielkość i budowa podstawnika arylowego przyłączonego do centrum chiralnego, które jednocześnie łączy się z grupą metylową, atomem wodoru i grupą karboksylową, ma tu największe znaczenie. Można to udowodnić przy użyciu grzyba *Verticillium lecanii*. Zestaw enzymów, którymi dysponuje ten grzyb sprawia, iż w przypadku ibuprofenu, indoprofenu, suprofenu, flurbiprofenu i fenoprofenu zachodzi jednokierunkowa inwersja chiralna, gdzie enancjomer *R* przekształca się w swój antymer *S*, a tylko ketoprofen wykazuje inwersję w odwrotnym kierunku. Te wyniki sugerują, iż *Verticillium lecanii* może być wykorzystywany do produkcji czystych enancjomerów wymienionych związków [59]. Innym rodzajem grzyba, mogącego służyć do produkcji czystych enancjomerów, a konkretnie optycznie czystego *S*-atliprofenu, jest *Candida rugosa* [60], natomiast bakterie z rodzaju *Nocardia diaphanozonaria* są wykorzystywane w syntezie kwasu *R*-2-fenylpropionowego [61].

2.1.1. Ketoprofen

Ketoprofen (kwas 2-(3-benzoilofenilo)propanowy) jest obecnie jednym z najczęściej stosowanych NPLZ. Został zsyntetyzowany w 1968 roku, ale wprowadzono go na rynek dopiero w 1986 roku. Profen ten jest dostępny do działań terapeutycznych głównie w formie racematu, ma zastosowanie w leczeniu objawowym zmian zapalnych i zwyrodnieniowych w schorzeniach reumatycznych, czasem też jest stosowany do łagodzenia niektórych zespołów bólowych. Szybko wiąże się z białkami krwi, pomimo swojej niskiej kwasowości, i dzięki temu najwyższe stężenie we krwi osiąga już po pół godziny od chwili przyjęcia [7]. Na rynku są dostępne preparaty zawierające ketoprofen również bez recepty (np. Fastum, Ketonal Lek, Ketoprom, Ketopronil, Ketospray, Ultrafastin [62]), choć są one przeznaczone tylko do stosowania zewnętrżno-miejscowego. Jeden z preparatów dostępnych na receptę to Dexak zawierający tylko *S*-ketoprofen. Pomimo, iż terapeutyczne właściwości enancjomerów ketoprofenu nie są szczegółowo poznane, *R*-ketoprofen uważa się za słaby inhibitor cyklooksygenazy, nawet 1000 razy słabszy niż jego antymer *S*, a co za tym idzie, ma on tylko marginalny wkład we właściwości przeciwzapalne leku. *S*-ketoprofen wstrzymuje syntezę prostaglandyny PGE₂, odpowiedzialnej za rozszerzanie naczyń krwionośnych i uważa się, że jest odpowiedzialny za właściwości przeciwzapalne tego APA. Dlatego też opublikowano oparte na badaniach zalecenia, by preparaty lecznicze sprzedawać tylko w formie *S*, co miało zapobiegać szkodliwym skutkom ubocznym, takim, jak uszkodzenia układu pokarmowego, czy nerek [63]. Jednakże dowiedziono, iż przyczyną głównego efektu ubocznego wywołwanego przez NPLZ, czyli uszkodzenia żołądka, jest redukcja syntezy prostaglandyny PGE₂, która jest silnym inhibitorem syntezy kacheksyny (czynnik martwicy nowotworu, ang. tumor necrosis factor, TNF) [64,65]. Kacheksyna należy do grupy cytokin (są to cząsteczki białkowe wpływające na wzrost, rozmnażanie i pobudzenie komórek biorących udział w odpowiedzi odpornościowej oraz komórek krwiotwórczych), odgrywających kluczową rolę w stanach zapalnych, których produkcja może częściowo maskować właściwości przeciwbólowe *S*-ketoprofenu oraz mieć udział w uszkodzaniu układu pokarmowego. Na tej podstawie można wnioskować, iż *R*-ketoprofen przyczynia się do ogólnej aktywności racematu, odgrywając główną rolę w działaniu przeciwbólowym i w przeciwieństwie do swojego antymeru, nie ma on istotnego wpływu na produkcję cytokin [66,67]. Mimo to skupiono się na produkcji optycznie czystego *S*-ketoprofenu.

Jest kilka metod pozyskiwania antymeru *S* z racemicznej mieszaniny ketoprofenu lub z optycznie czystej pochodnej tego kwasu. Oczywiście każda z tych metod ma swoje

ograniczenia. Do najpopularniejszych i najszerzej przebadanych należą synteza asymetryczna oraz chromatografia [68]. Kolejną z nich jest diastereomeryczna krystalizacja, która wykorzystuje enancjomerycznie czysty kwas lub zasadę, tworzące w reakcji z racematem diastereomeryczną sól. Czysty *S*-ketoprofen jest otrzymywany przez selektywną krystalizację diastereomerycznej soli [69,70]. Inną metodą jest krystalizacja selektywna, polegająca na zmieszaniu przesyconego roztworu racematu z kryształkami danego enancjomeru, które w następstwie narastają selektywnie [71,72]. Jedną z szerzej stosowanych metod jest rozdział kinetyczny wykorzystujący enzymy (głównie lipazy, spełniające rolę katalizatorów) pochodzące od bakterii lub grzybów (Rys. 4). Lipaza pozyskiwana z bakterii *Serratia marcescens* po odpowiedniej modyfikacji jest używana do biokatalitycznego otrzymywania *S*-ketoprofenu [74]. Pod tym samym kątem badano enzymy grzyba *Verticillium lecanii*, ale otrzymano wynik odwrotny. Gdy jako substratu użyto racematu, końcowym produktem był skalemat ze znaczącą przewagą antymeru *R*. W przypadku *R*-ketoprofenu jako substratu tylko niewielki procent konwertował do antymeru *S*, natomiast z *S*-ketoprofenu otrzymano racemat [59].



Rys. 4. Jeden ze szlaków syntezy *S*-ketoprofenu zachodzącej z udziałem lipazy pochodzącej od grzyba *Candida antractica* [68,73].

Ostatnio jednak zaczęto badać enzymatyczne reaktory membranowe (ang. enzymatic membrane reactors, EMR) pod kątem produkcji *S*-ketoprofenu, przy których wykorzystuje się kinetyczny rozdział za pomocą enzymów. Taki proces pozyskiwania optycznie czystego antymeru jest bardziej wydajny, a co za tym idzie, wysoko ekonomiczny [68,75].

Jak wspomniano wyżej, ketoprofen jest, jak dotychczas, jedynym przedstawicielem grupy kwasów arylopropionowych, które mogą ulegać inwersji chiralnej w jednym kierunku, w obu kierunkach, lub w ogóle jej nie ulegają [9]. Chociaż często uważa się, iż inwersja zachodzi jednokierunkowo od antymeru *R* do *S*, odwrotna reakcja może występować u niektórych gatunków, jakkolwiek jej szybkość jest bardzo nieznaczna [17]. W przypadku ketoprofenu stopień zachodzenia inwersji chiralnej jest zależny od tego, czy w organizmie występuje stan zapalny, a jeśli tak, to wówczas następuje spadek szybkości inwersji [15,76]. Wynika to

również z faktu, że ketoprofen jest metabolizowany także poprzez glukuronidację (proces sprzęgania leku m.in. z kwasem glukuronowym, odgrywający ogromną rolę w detoksykacji), a labilności glukuroidowych pochodnych *S*- i *R*-ketoprofenu są różne, w zależności od stanu zdrowia leczonego osobnika [7,49,77].

Jednokierunkowa inwersja chiralna *R*-ketoprofenu do jego antymery *S* została stwierdzona u ludzi. Po podaniu ochotnikom preparatów zawierających racemiczny ketoprofen, w ich moczu wykryto różne ilości poszczególnych enancjomerów ketoprofenu. Okazało się, iż *S*-ketoprofenu było więcej, niż jego antymery. Można to wytłumaczyć w ten sposób, że *R*-ketoprofen ulega ograniczonej inwersji do swojego antymery (na poziomie 9-12%), co potwierdzono faktem, iż po przyjęciu czystego enancjomeru *R* w moczu wykryto również enancjomer *S*, natomiast sytuacja odwrotna nie zachodziła [56,78-84]. Ten sam kierunek inwersji został zaobserwowany u takich zwierząt, jak szczury [56,81,85-89], chomiki [87], świnki morskie [87], króliki [87,90], psy [56,87], koty [36,56,91], owce [56,92], małpy makaki [87,93], konie [94,95] i bydło [96,97]. Różnice w inwersji chiralnej *R*-ketoprofenu u różnego wiekowo bydła (cielaki, dorosłe osobniki) mogą być wyjaśnione poprzez różne działanie syntetazy acylo-CoA, wynikające z ilości lipidów w stosowanej diecie. Czynniki dietetyczne i ksenobiotyki mają zdolność do wpływania na tworzenie acylo-CoA. Inwersja w kierunku od antymery *S* do *R* jest rzadka i występuje u myszy CD-1. Po jednorazowym podaniu racematu lub czystego enancjomeru ketoprofenu męskiemu osobnikowi zaobserwowano znaczną inwersję w obu kierunkach [98].

2.1.2. Flurbiprofen

Flurbiprofen (kwas 2-[(3-fluoro-4-fenilo)fenilo]propanowy) po raz pierwszy zsyntetyzowano w roku 1973, ale dopiero 15 lat później wprowadzono go na rynek w postaci soli sodu pod nazwą Ocufen. Stosuje się go podczas zabiegu usunięcia katarakty, aby zapobiegać śródoperacyjnemu zwężaniu się źrenicy wywoływanemu przez prostaglandyny. W 1988 roku flurbiprofen przedstawiony w formie doustnego preparatu o nazwie Ansaïd zyskał natychmiastową akceptację [7]. W Polsce na receptę są dostępne takie preparaty, jak Ocuflur (krople stosowane przy stanach zapalnych przedniej komory oka) i Flugalin (tabletki stosowane przy chorobach reumatycznych i bólach miesiączkowych), natomiast bez recepty można dostać Strepsils Intensive (szeroko reklamowane tabletki na ból gardła) [99,100]. Ta krótka lista wiele mówi o tym, jak szerokie zastosowanie ma flurbiprofen. Tak, jak w przypadku większości NLPZ, jest on sprzedawany w formie racematu.

Za właściwości przeciwzapalne flurbiprofenu odpowiada tylko enancjomer *S*, także jego właściwości przeciwbólowe są nawet 80 razy większe, niż antymeru *R*. Dlatego też podanie czystego enancjomeru flurbiprofenu powoduje, iż działa on bardziej wybiórczo, *R*-flurbiprofen w przypadkach sporadycznego bólu, a *S*-flurbiprofen w zaburzeniach reumatycznych. Dzieje się tak dlatego, iż antymer *R* nie ma wpływu na syntezę prostaglandyn, a w ten sposób działa tylko antymer *S* [66,101-106]. *S*-Flurbiprofen wpływa również na obniżenie szkodliwych skutków ubocznych, takich, jak uszkodzenia układu pokarmowego, czy nerek [63], z tym, że tak samo jak w przypadku *S*-ketoprofenu, może wywoływać produkcję kacheksyny, redukując syntezę prostaglandyny PGE₂ [67]. W latach 90-tych XX wieku zaczęto sprzedawać Ocuflur, w którego skład wchodził tylko *S*-flurbiprofen, właśnie ze względu na jego wybiórcze własności w stosunku do enzymu COX [106].

Jedną *R*-flurbiprofen także ma swoje indywidualne lecznicze własności. W 2008 roku zakończono badania nad Flurizanem zawierającym tarenflurbil, czyli *R*-flurbiprofen. Antymer ten znalazł zastosowanie jako modulator γ -sekreazy, co sprawia, iż może on być użyty w leczeniu choroby Alzheimera. Pod wpływem enzymu γ -sekreazy obecne we wszystkich komórkach organizmu białko APP jest cięte w nietypowy sposób, tak że w mózgu powstają cząsteczki nierozpuszczalnego β -amyloidu, które odkładają się w postaci płytek toksycznych dla neuronów. *R*-Flurbiprofen nie tylko sprawia, że powstaje mniej długich pasm β -amyloidu, lecz także sprzyja produkcji krótkich pasm, dzięki czemu w mózgu nie tworzą się toksyczne płytki. Co więcej, zmienia on bezpośrednio strukturę β -amyloidów już istniejących w mózgu [107-110]. *R*-Flurbiprofen zyskał również rekomendacje do leczenia raka prostaty oraz raka jelita grubego po obiecująco zakończonych badaniach przeprowadzonych na myszach [111,112].

Metabolizm flurbiprofenu przebiega przez chiralne hydroksy- i metoksy-pochodne. W końcowej fazie jest on usuwany wraz z moczem w postaci sprzężonej z siarczanem lub glukuronianem. Około 20% flurbiprofenu jest wydalone w postaci niezmienionej, a żaden z jego metabolitów nie posiada szczególnych właściwości przeciwzapalnych [7,102].

Racemiczny flurbiprofen można uzyskać w wyniku reakcji Suzuki katalizowanej palladem na węglu. Proces ten ma kilka etapów, a na początkowe substraty składają się metylomalonian etylu oraz 2,4-difluoronitrobenzen. Wydajność takiej reakcji może wynieść nawet 98% [113]. *R*-Flurbiprofen można również uzyskać z metylomalonianu etylu, ale poprzez dekarboksylację katalizowaną enzymem (dekarboksylazą arylomalonianu) [114]. Z

enancjomeru R można wyprodukować jego antymer przy użyciu grzyba *Verticillium lecanii* [59].

Jak wspomniano wyżej, flurbiprofen jest przedstawicielem grupy kwasów arylopropionowych, które mogą ulegać inwersji chiralnej w jednym kierunku, lub w ogóle jej nie ulegają [9]. Tak, jak w przypadku innych profenów, proces inwersji jest zależny od rodzaju organizmu i substratu. Flurbiprofen nie ulega inwersji u ludzi [103,115], a także u gryzoni [115]. W przypadku zwierząt inwersja R-flurbiprofenu do jego antymeru występuje w różnym stopniu u świnek morskich (100%) [116], psów (40%) [116], szczurów i myszokoczków (poniżej 5%) [32,86,101,116]. Odwrotna inwersja (S do R) nie ma miejsca u zwierząt, a jedynie z pomocą grzyba *Verticillium lecanii* można tego dokonać na poziomie kilku procent [59].

Popularność flurbiprofenu nie jest tak wysoka, jak innych profenów i w ogóle innych NLPZ, ale spektrum jego zastosowań naprawdę zadziwia. Szczególnie, gdy weźmie się pod uwagę, że jest on silniejszy w działaniu od ibuprofenu czy aspiryny, albo też uwzględni się szybkość jego działania, a następnie usuwania z organizmu, które są o wiele większe, niż dla innych, pokrewnych związków [7].

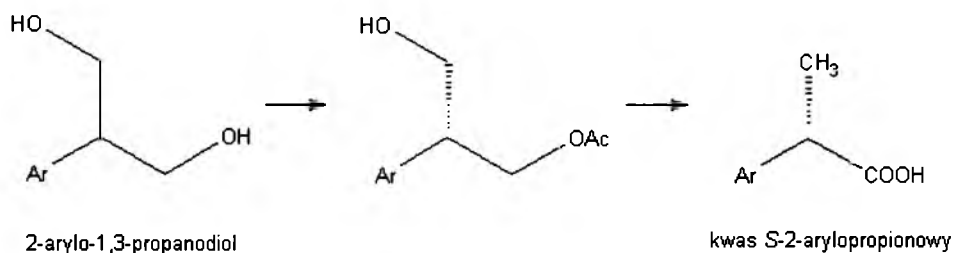
2.2. Oscylacyjna inwersja chiralna w układach abiotycznych

Liczba doniesień literaturowych na temat samorzutnej inwersji chiralnej profenów w układach abiotycznych nie dorównuje liczbie doniesień o inwersji *in vivo*, pokrótce przedstawionej we wcześniejszych podrozdziałach. W większości dotyczą one kontrolowanej produkcji jednego z enancjomerów (w tym kontrolowanej racemizacji) i metod rozdziału antymerów profenów, głównie z użyciem chromatografii, w których jednak nie ma mowy o samorzutnej oscylacyjnej inwersji.

Według Wolffa [117] racemizacja związków chiralnych, w tym i profenów, to proces nieodwracalny, zakończony w momencie, gdy 50% optycznie czystego enancjomeru przekształci się w swój antymer. Zarówno metoda wybrana do sprawdzenia rezultatu, jak i kontrola racemizacji są ważnymi elementami syntezy asymetrycznej, ponieważ oddziałują na wynik prowadzonego procesu, czyli na optyczną czystość produktu. Dla α -podstawionych pochodnych kwasów karboksylowych najlepszą metodą jest racemizacja katalizowana zasadą, która może osiągnąć nawet 100% wydajność [118-120]. Aby po procesie racemizacji wyizolować dany enancjomer, stosowana jest transformacja asymetryczna, wywołana krystalizacją (ang. *crystalization-induced asymmetric transformation*) z roztworu.

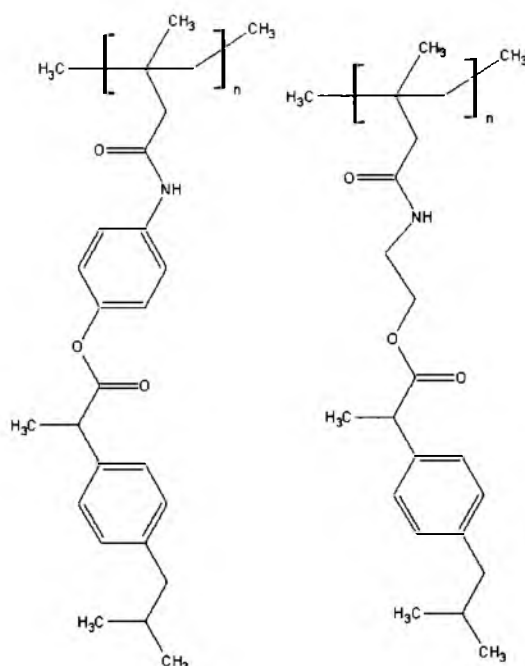
W przypadku ibuprofenu osiągnięto 75% wydajność zarówno dla *R*- jak i *S*-ibuprofenu (w zależności od stosowanych warunków prowadzenia procesu) [120]. Metoda ta w ogóle nie sprawdziła się, jeśli chodzi o naproksen [120] i dopiero, gdy użyto jako substratu estru etylowego naproksenu, otrzymano antymer *R* tegoż związku z prawie 80% wydajnością [118]. Natomiast metoda krystalizacji z inkluzją dała bardzo dobre efekty dla naproksenu. W tym przypadku z racematu otrzymano ponad 95% antymeru *S* [121]. W cytowanych publikacjach do zbadania wydajności optycznie czystego produktu końcowego użyto chiralnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Inną metodą kontrolowanego otrzymywania pochodnych kwasu 2-fenylpropionowego jest transformacja chemoenzymatyczna. Kluczowym etapem tej syntezy jest asymetryczne acetylowanie prochiralnego 2-arylo-1,3-propanodiolu w obecności lipazy (Rys. 5). Dla *S*-naproksenu i *S*-ibuprofenu osiągnięto tym sposobem wydajności na poziomie odpowiednio 69 i 54%, co zostało potwierdzone metodami IR, ^1H NMR, MS i TLC [122].



Rys. 5. Chemoenzymatyczna transformacja diolu w *S*-profen [122].

Jak już wcześniej wspomniano, profeny to szeroko reklamowane i ogólnie dostępne niesteroidowe leki przeciwzapalne. Ich daty przydatności deklarowane przez producentów często sięgają kilku lat od momentu produkcji. Przykładowo *S*-flurbiprofen w formie soli sodowej sprzedawanej jako krople do oczu Ocuflur ma zadeklarowany okres przydatności 36 miesięcy w zamkniętej plastikowej butelce. Badania to potwierdzające mówią, iż po 48 miesiącach przechowywania w próbce zawierającej początkowo *S*-flurbiprofen wykryto tylko 0,1% *R*-flurbiprofenu [106]. Profeny zostały także połączone z biopolimerami, jako nośnikami poprawiającymi właściwości terapeutyczne leków [123]. W związku z tym przeprowadzono eksperyment w układzie abiotycznym sprawdzający, w jakim stosunku ilościowym są uwalniane enancjomery ibuprofenu z nośnika biopolimerowego. Z pomocą elektroforezy kapilarnej wykryto enancjomeryczny nadmiar uwalnianego *S*-ibuprofenu sięgający 10%. Zasugerowano, iż wynika to z wyższej reaktywności estru *S*-ibuprofenu, jaki tworzy się podczas przyłączania profenu do nośnika biopolimerowego (Rys. 6) [124,125].

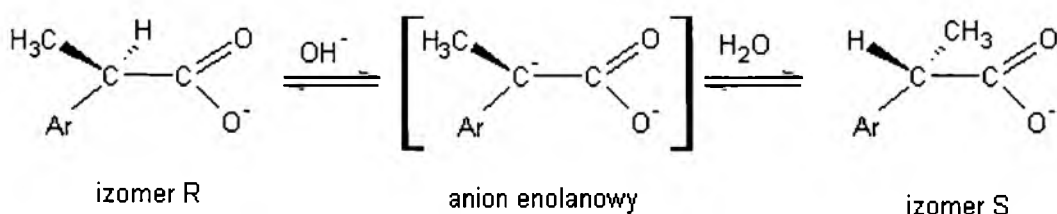


Rys. 6. Ibuprofen umieszczony na nośnikach biopolimerowych [125].

W doniesieniach dotyczących rozdziału enancjomerów kwasów 2-arylopropionowych brak wzmianek o samorzutnej oscylacyjnej inwersji, a chodzi jedynie o to, by skutecznie rozdzielić antymery [126,127]. Pierwsze wzmianki o inwersji chiralnej profenów rozpuszczonych w niskocząsteczkowych rozpuszczalnikach wspomniano w cyklu prac [128-133], które ostatecznie zaowocowały rozprawą doktorską Piętki [134]. Skupił się on na badaniach kwasu *R,S*-2-fenylpropionowego, *S*-ibuprofenu i *S*-naproksenu w roztworach etanolo-wodnym, dichlorometanu i soli fizjologicznej. Podczas sprawdzania oraz udoskonalania procedury chiralnego rozdziału *S*- i *R*-profenów metodą chromatografii cienkowarstwowej odkryto niestabilność współczynnika retardacji R_F danego antymery sięgającą daleko poza granice błędu ($\Delta R_F=0,02$) [128-131]. Niestabilność ta była związana z czasem przechowywania danego profenu w postaci roztworu. Jednocześnie zaobserwowano zmiany kształtu profili stężeniowych oraz zmiany pozycji maksimum tych profili na densytogramach dla wszystkich badanych profenów. Wąskie i symetryczne kształty profili stężeniowych pasm chromatograficznych *S*-ibuprofenu oraz *S*-naproksenu, w położeniach skrajnych na chromatogramie (tzn. w położeniach o najniższej i najwyższej wartości współczynnika R_F) wskazują na to, iż w obu przypadkach mamy do czynienia z pojedynczymi indywiduami chemicznymi. Ponadto wartości liczbowe współczynnika R_F dla pojawiających się najniżej profili stężeniowych odpowiadają pozycji enancjomerów *R* badanych profenów, natomiast wartości liczbowe parametru retencji R_F dla pojawiających się

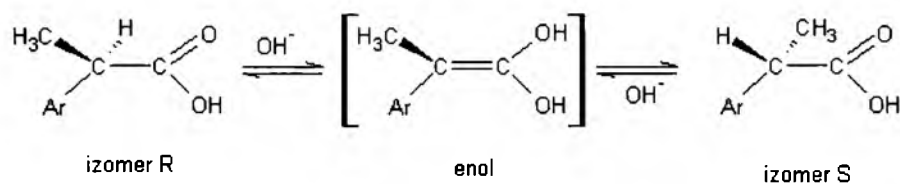
najwyżej profili stężeniowych odpowiadają pozycji enancjomerów S. Na tej podstawie wynioskowano, iż profil o najniższej wartości współczynnika R_F odpowiada czystemu enancjomerowi R, a profil o najwyższej wartości współczynnika R_F odpowiada czystemu enancjomerowi S. Profile stężeniowe pasm chromatograficznych w pozycjach pośrednich między ekstremalnymi wskazują natomiast na obecność dwóch nie całkowicie rozdzielonych indywiduów chemicznych, jakimi są najprawdopodobniej antymery S i R. W ten sposób Piętka doszedł do przekonania, że obserwowane niestabilności mogą wynikać z przestrzennej transformacji strukturalnej jednego enancjomeru w jego antymer. Aby potwierdzić samorzutną oscylacyjną inwersję chiralną profenów przeprowadzono stosowne badania polarymetryczne, podczas których odkryto, iż wartość skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ trzech wybranych profenów była również niestabilna w czasie prowadzenia eksperymentu, podobnie jak wartość współczynnika R_F . Przykładowo, dla *S*-naproksenu zmiana skręcalności właściwej kształtowała się od wartości -70° do $+350^\circ$. W tej sytuacji badania polarymetryczne wydały się potwierdzić ciągłe przejścia jednej z enancjomerycznych struktur trzech badanych profenów w drugą, będącą jej lustrzanym odbiciem. Ponadto odkryto, iż amplituda oscylacyjnych zmian współczynnika R_F i skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ jest wyraźnie większa w niższej temperaturze, niż w temperaturze wyższej [134].

Powstaje pytanie o molekularny mechanizm opisanego przez Piętkę zjawiska. Literatura donosi o kilku mechanizmach transformacji jednego enancjomeru w drugi. Opisany został mechanizm inwersji anionu kwasu karboksylowego, oparty na tworzeniu anionu enolanowego [134,135]. Mechanizm ten polega na tym, że karboanion, w którym atom węgla jest obdarzony ładunkiem ujemnym i znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie wiązania π wiążącego go z tlenem, ma płaską konfigurację i może być trwały, a także traci swoją chiralność. Zatem w wyniku powtórnego przekształcenia anionu enolanowego w zwykły anion kwasu karboksylowego może nastąpić zjawisko inwersji chiralnej (Rys. 7).



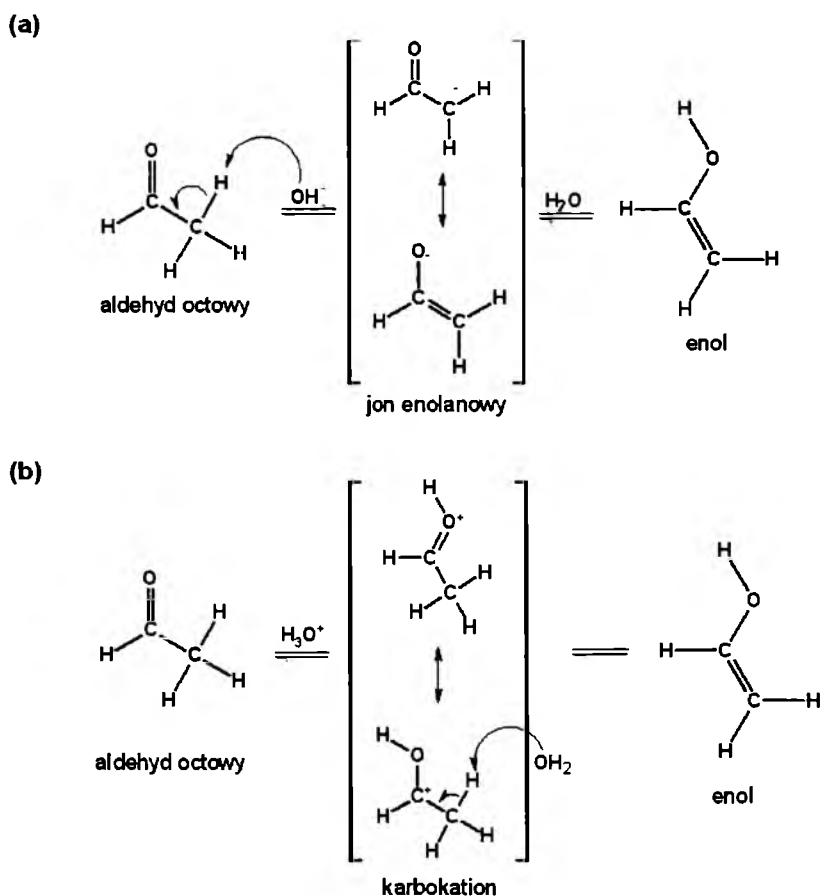
Rys. 7. Mechanizm inwersji anionu kwasu 2-arylopropionowego, oparty na tworzeniu anionu enolanowego [134,135].

Alternatywą może być mechanizm oparty na tautomerzacji keto-enolowej katalizowanej zasadą, podany dla kwasu 2-arylopropionowego (Rys. 8) [119,134].



Rys. 8. Mechanizm inwersji kwasu 2-arylopropionowego, oparty na tautomerzacji keto-enolowej [119,134].

Wiadomo także, że tautomerzacja keto-enolowa może przebiegać równie efektywnie, gdy katalizatorem jest kwas, co przedstawiono przykładowo przy pomocy mechanizmu katalizowanej zasadą i kwasem reakcji tworzenia enolu, przy czym związkiem wyjściowym jest aldehyd octowy (Rys. 9). Jednakże tautomerzacja keto-enolowa kwasów karboksylowych (lub powstawanie odpowiednich anionów enolanowych) stosunkowo łatwo zachodzi w środowisku zasadowym, natomiast praktycznie nie zachodzi w środowisku kwaśnym [134,136].



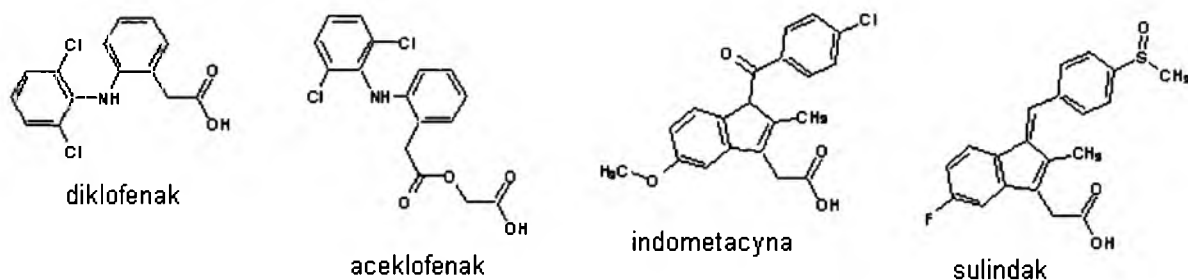
Rys. 9. Mechanizm katalizowanej zasadą i kwasem reakcji tworzenia enolu z aldehydu octowego [134,136].

Piętka wykonał serię odpowiednich badań, mających na celu udzielenie odpowiedzi na postawione powyżej pytanie o mechanizm samorzutnej oscylacyjnej inwersji chiralnej profenów. W jednym z przeprowadzonych eksperymentów wykazano, iż w środowisku zasadowym *S*-naproksen ulega szybkiej, strukturalnej inwersji i w znacznym stopniu przekształca się w *R*-naproksen, co nie wiąże się z oscylacyjnymi zmianami skręcalności właściwej roztworu. W drugim eksperymencie, przeprowadzonym w środowisku kwaśnym, *S*-naproksen nie ulegał strukturalnej inwersji i również nie wykazywał oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej. Gdyby samorzutne, oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej *S*-naproksenu były wynikiem np. przemian strukturalnych na poziomie supramolekularnym (tzn. powstawania agregatów molekularnych o zmiennej strukturze oraz o zmiennej liczbie przyporządkowanych cząsteczek), można by oczekiwać, iż w każdym z trzech roztworów (etanol-woda, etanol-kwas octowy i etanol-bufor pH=9) zaobserwowano by zbliżone, oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej. Tymczasem zmiany takie zaobserwowano wyłącznie w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym Woda oraz niższe alkohole, jako rozpuszczalniki amfiprotyczne, zachowują się jednocześnie jak słabe zasady i słabe kwasy. Obserwowane oscylacje skręcalności właściwej roztworów wybranych profenów znacznie silniej występują w roztworach etanolowo-wodnych, aniżeli w nisko polarnym rozpuszczalniku organicznym. Dodatkowo inwersja strukturalna profenów nie zachodzi bezpośrednio, ale poprzez stadium pośrednie, jakim jest powstawanie keto-enolu bądź anionu enolanowego (Rys. 7 i 8). Zatem kroki elementarne tego procesu posiadają charakter jonowy, ten zaś może najefektywniej zachodzić właśnie w środowisku wodnym [132,134].

Wyniki wykonanych przez Piętkę pomiarów spektroskopowych techniką ^1H NMR i innymi potwierdzają, iż roztwory profenów w rozpuszczalnikach niskocząsteczkowych nie są roztworami w pełni izotropowymi pod względem gęstości. Dlatego też można sądzić, iż anizotropia gęstości roztworów profenów w połączeniu z amfiprotycznym charakterem rozpuszczalnika etanolowo-wodnego wielce sprzyjają generowaniu oscylacji w przypadku oscylacyjnej inwersji chiralnej tych związków [133,134].

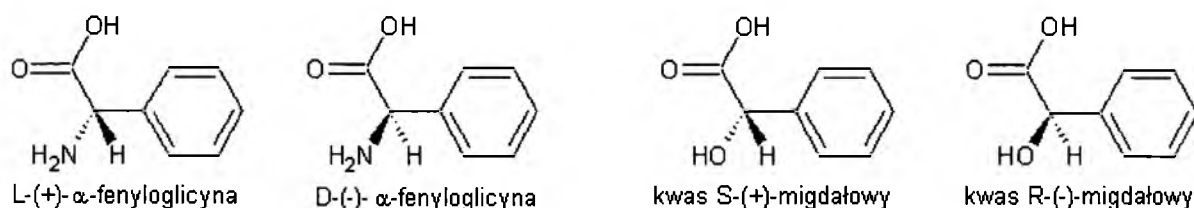
3. Znaczenie α -fenyloglicyny i kwasu migdałowego w procesach fizjologicznych

Wiele spośród kwasów arylooctowych należy, podobnie jak profeny, do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Diklofenak, aceklofenak, indometacyna i sulindak mają szczególne zastosowanie w reumatologii [137] (Rys. 10).



Rys. 10. Wzory strukturalne wybranych kwasów arylooctowych będących lekami.

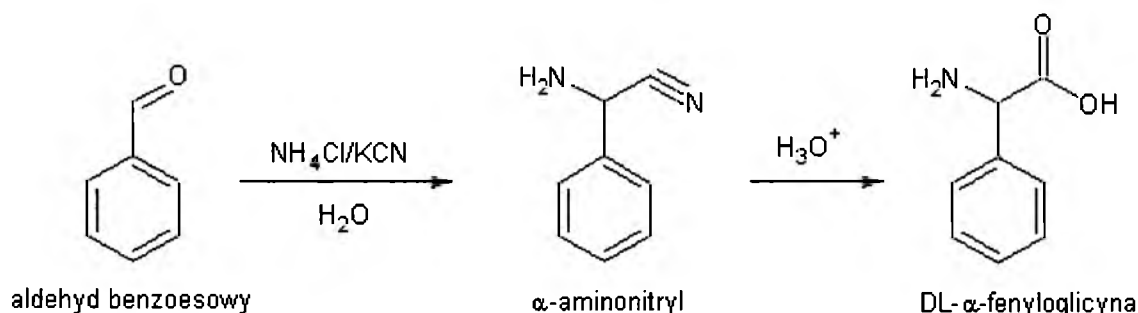
Kwas migdałowy mający również właściwości lecznicze stosuje się obecnie do zwalczania zmian skórnych, a α -fenyloglicyna wchodząca w skład wielu peptydów zwiększa ich zdolności lecznicze. Oba te związki charakteryzują się stosunkowo niską masą cząsteczkową i tym, że są one chiralne – zatem występują w postaci dwóch enancjomerów (Rys. 11).



Rys. 11. Wzory strukturalne enancjomerów α -fenyloglicyny i kwasu migdałowego.

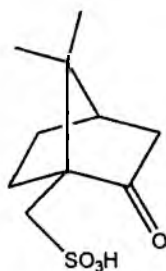
3.1. α -Fenyloglicyna

α -Fenyloglicyna (kwas 2-amino-2-fenylooctowy) jest naturalnym aminokwasem niebiałkowym, najczęściej otrzymywanym metodą syntezy Streckera z aldehydu benzoowego (Rys. 12) [136].



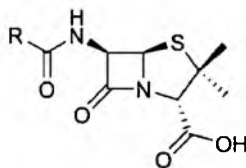
Rys. 12. Schemat syntezy *D,L*(\pm)- α -fenyloglicyny z aldehydu benzoowego [136].

W przemysłowej produkcji optycznie czystej α -fenyloglicyny wykorzystuje się proces Andeno, na który składa się w pierwszym etapie synteza Streckera, a następnie mieszaninę racemiczną zadaje się optycznie czynnym kwasem *D*-kamforosulfonowym (Rys. 13) w celu wydzielenia pożądanego enancjomeru. Dzieje się to na skutek tworzenia diastereoizomerycznych soli między *D*(-)- α -fenyloglicyną a kwasem *D*-kamforosulfonowym oraz między *L*(+)- α -fenyloglicyną a kwasem *D*-kamforosulfonowym. W tym przypadku sól „*D-D*” jest znacznie mniej rozpuszczalna w zastosowanym rozpuszczalniku (np. woda, metanol, etanol lub ich mieszanina), niż sól „*L-D*” [138].



Rys. 13. Kwas kamforosulfonowy.

Enancjomery α -fenyloglicyny są ważnym surowcem w otrzymywaniu antybiotyków β -laktamowych, a konkretnie penicylin półsyntetycznych, takich, jak ampicylina (Rys. 14).



Rys. 14. Ogólny wzór penicylin.

Mechanizm działania penicylin jako antybiotyków polega na blokowaniu aktywności enzymów bakteryjnych, biorących udział w ostatnim etapie budowy ściany komórki bakteryjnej. Taką rolę spełnia właśnie łańcuch boczny penicyliny, w skład którego wchodzi część cząsteczki α -fenyloglicyny. Bakteria pozbawiona prawidłowo działającego enzymu nie jest wtedy w stanie syntetyzować ściany komórki bakteryjnej. Prowadzi to do upośledzenia jej zdolności życiowych i w ten sposób zwiększa się przepuszczalność ściany komórkowej. Takie uszkodzenie prowadzi po pewnym czasie do zwiększenia aktywności bakteryjnych enzymów, powodując samozniszczenie bakterii. W związku z tym penicyliny stosuje się w leczeniu takich zakażeń, jak:

- zakażenia paciorkowcowe: angina, zapalenie ucha środkowego, ropnie, ropowice, posocznice,
- zakażenia gronkowcowe: ropnie, zapalenie szpiku, posocznice, zapalenie pneumokokowe płuc,
- zapalenie meningokokowe opon mózgowych,
- błonica, tężec, węglik, kiła.

α -Fenyloglicyna w formie jednego ze swych enancjomerów wchodzi w skład peptydu o budowie:



gdzie: A i B to określone grupy wyszczególnione w [139]. Peptyd ten wykazuje działanie podobne do gastryny. Poza wydzielaniem kwasu solnego w żołądku, pobudza wydzielanie soku żołądkowego, wzmacnia perystaltykę przewodu pokarmowego, kurczy dolny zwieracz przełyku (sygnalizuje, że żołądek jest pełen i nie może przyjąć więcej pokarmu). Wywiera wpływ troficzny na śluzówkę żołądka, zapewniając jej prawidłowy stan. Wzmacnia przepływ krwi przez układ pokarmowy.

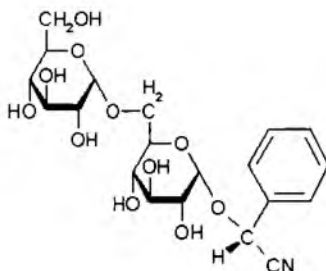
Pochodne amidowe *D,L*-(±)- α -fenyloglicyny wykazują silne i selektywne powinowactwo do czynnika Xa jako jego inhibitory, które mogą być stosowane do zwalczania oraz zapobiegania chorobom tromboembolicznym, takim jak tromboza, zawał mięśnia sercowego, arterioskleroza, apopleksja, dusznica bolesna, czy restenoza po angioplastyce. Czynniki Xa jest jedną z proteaz biorących udział w złożonym procesie krzepnięcia krwi. Katalizuje on przemianę protrombiny w trombinę, a ta z kolei rozszczepia fibrynogen na monomery fibryny, które, po usieciowaniu, mają zasadniczy wpływ na powstawanie skrzepu. Aktywacja trombiny może powodować wystąpienie chorób zakrzepowych, zaś jej inhibicja może hamować tworzenie fibryny, która bierze udział w tworzeniu skrzepów [140].

D-(-)- α -Fenyloglicyna wspomaga działanie lewodopy, która to jest metabolitem pośrednim w szlaku syntezy adrenaliny, a także należy do najskuteczniejszych leków stosowanych w chorobie Parkinsona. Podnosi poziom testosteronu oraz zwiększa syntezę i sekrecję hormonu wzrostu. Wspomaganie to polega na wiązaniu tych dwóch aminokwasów w dipeptyd [141]. Antymer α -fenyloglicyny chemicznie związany z lewodopą zwiększa jej możliwości łączenia się z albuminą surowicy krwi. To wskazuje, iż α -fenyloglicyna ze swoim powinowactwem do albuminy ma możliwość odgrywania znaczącej roli w zwiększaniu dostępności tego leku.

Z wymienionych przykładów jasno wynika, że α -fenyloglicyna nie posiada właściwości leku działającego bezpośrednio. Okazuje się jednak, iż jest ona ważnym surowcem w ich otrzymywaniu, czy też wspomaga ich działanie przez wzmocnienie go nawet kilkakrotnie.

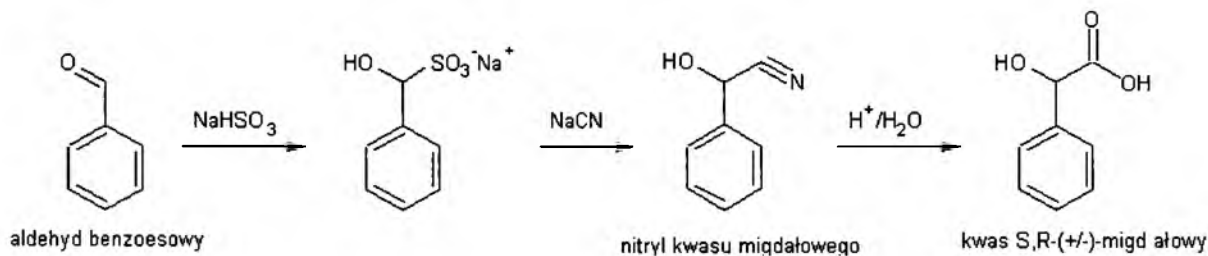
3.2. Kwas migdałowy

Kwas migdałowy (kwas 2-hydroksy-2-fenylooctowy) należy do grupy α -hydroksykwasów (ang. α -hydroxy acids, AHA) i jest ich najprostszym aromatycznym przedstawicielem. Został odkryty w 1909 roku przez Waltera i Krieblego podczas ogrzewania mieszaniny amygdaliny (ekstraktu z gorzkich migdałów, Rys. 15) z rozcieńczonym kwasem solnym. Jego zwyczajowa nazwa pochodzi od niemieckiego „Mandel”, co oznacza migdał.



Rys. 15. Wzór strukturalny amigdaliny.

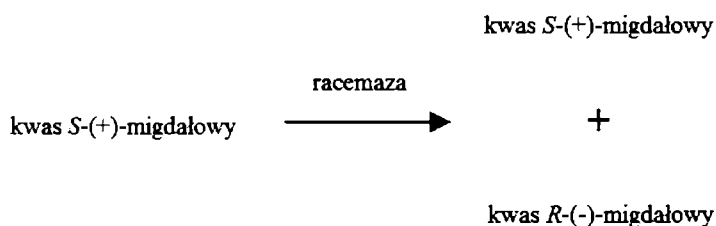
Podobnie jak α -fenyloglicynę, kwas migdałowy można otrzymać m.in. z aldehydu benzoowego (Rys. 16) [142].



Rys. 16. Schemat syntezy kwasu *R,S*-(±)-migdałowego z aldehydu benzoowego [142].

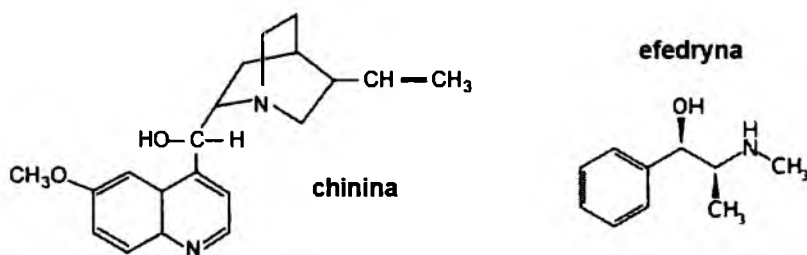
Kwas migdałowy jest stosowany w przemyśle farmaceutycznym w postaci jednego z enancjomerów i dlatego wyselekcjonowanie do dalszej obróbki czystego kwasu *S*-(+)-migdałowego lub czystego kwasu *R*-(-)-migdałowego jest niezwykle ważne. Najczęściej stosuje się metodę wyodrębniania z użyciem szczepu bakteryjnego, na przykład należącego do klasy *Pseudomonas*, rodzaju gram-ujemnych, tlenowych bakterii, którego niektóre gatunki mogą być patogenne dla roślin i zwierząt [143]. Rozdział polega na tym, iż użyty szczep selektywnie asymiluje kwas *S*-(+)-migdałowy z racematu wyprodukowanego na drodze chemicznej syntezy, jednocześnie pozostawiając kwas *R*-(-)-migdałowy w zastosowanej pożywce [144], lub rozkładając kwas *R*-(-)-migdałowy do kwasu benzoowego i jego

pochodnych [145,146]. Innymi klasami bakterii, stosowanymi w podobny sposób, mogą być *Alcaligenes* [147], *Gibberella* [148], a także *Burkholderia* [149]. Co ciekawe, enzym będący racemazą i pochodzący od konkretnego szczepu bakterii *Pseudomonas putida* powoduje chiralną inwersję kwasu *S*-(+)-migdałowego do jego antymery (Rys. 17) [150]. Przechodzenie jednego enancjomeru kwasu migdałowego w drugi obserwuje się również u najliczniejszego rzędu ssaków, czyli u gryzoni, a w szczególności u szczurów [151].



Rys. 17. Inwersja kwasu *S*-(+)-migdałowego pod wpływem racemazy pochodzącej od *Pseudomonas putida* [9].

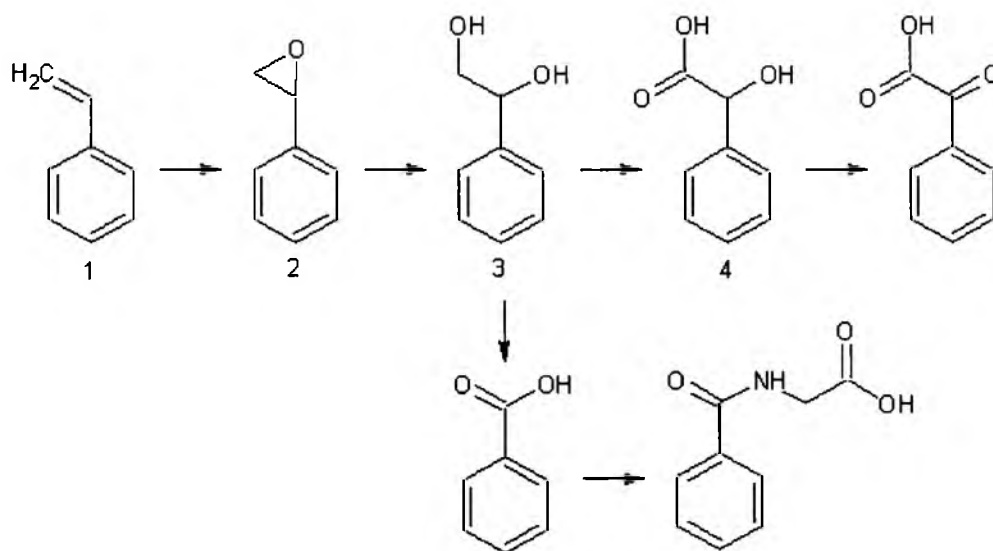
Krystalizacja jest również bardzo dobrą metodą rozdzielania enancjomerów kwasu *R,S*-(±)-migdałowego. Opiera się ona, podobnie jak przy przemysłowym otrzymywaniu optycznie czynnej α -fenyloglicyny, na tworzeniu soli diastereoizomerycznych między jednym z antymery kwasu migdałowego a czynnikiem derywatyzującym, którym mogą tu być dwie substancje: (-)-efedryna rozpuszczona w etanolu albo chinina rozpuszczona w metanolu (Rys. 18) [152].



Rys. 18. Związki stosowane do rozdzielania enancjomerów kwasu *R,S*-(±)-migdałowego.

Kwas migdałowy jest głównym metabolitem styrenu i stosuje się go jako biologiczny wskaźnik zawodowego narażenia pracowników na styren, z uwagi na to, iż związek ten działa w sposób negatywny na skórę i centralny układ nerwowy [153-155]. Styren (1) w pierwszej kolejności jest metabolizowany w wątrobie do chiralnego epoksydu (2), następnie do fenyloetanodiolu (3), a na końcu do kwasu migdałowego (4) (Rys. 19) [156]. Następnie kwas migdałowy jest wydalany wraz z moczem. Ze względu na różnice w biologicznym działaniu każdego z enancjomerów tlenku styrenu oraz chcąc oznaczyć ilościowo każdy z nich, oznacza

się stosunek ilościowy enancjomerów kwasu *R,S*-(±)-migdałowego, który jest proporcjonalny do stosunku ilościowego antymerów tlenku styrenu. Metodami oznaczania mogą tu być chromatografia gazowa z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (GC-FID) lub wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) na kolumnie polimerowej z nadrukiem molekularnym (MIP) [157-159].



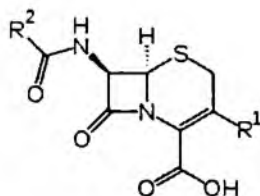
Rys. 19. Biotransformacja styrenu *in vivo* [156].

Enancjomerów kwasu *R,S*-(±)-migdałowego używa się także do takich zadań, jak rozdział chiralny racemicznych amin i alkoholi [160,161]. Wybrany antymer kwasu migdałowego gra tu rolę czynnika derywatyzującego.

Antymery kwasu *R,S*-(±)-migdałowego i ich pochodne są szeroko stosowane w syntezie wielu farmaceutyków, z czego najważniejszymi są, podobnie jak w przypadku α -fenyloglicyny, półsyntetyczne penicyliny (Rys. 14) oraz cefalosporyny (Rys. 20) [162-164]. Cefalosporyny, podobnie jak penicyliny, są dużą rodziną antybiotyków β -laktamowych o szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego i względnie małej toksyczności. Ich stosowanie jest ograniczane przede wszystkim wysoką ceną. Główne rejony zastosowania cefalosporyn to:

- zapobieganie zakażeniom po operacjach,
- leczenie zakażeń wywołanych pałeczkami gram-ujemnymi - zakażenie pałeczką okrężnicy, pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae*, w tym posoczniciami.

Lecznicze działanie cefalosporyn polega na kowalencyjnym wiązaniu się z centrum aktywnym bakteryjnych enzymów, blokując ich działanie i hamując w ten sposób proces syntezy bakteryjnej ściany komórkowej [165].



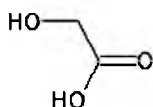
Rys. 20. Ogólny wzór cefalosporyn.

W niektórych europejskich szpitalach kwas migdałowy jest stosowany przy infekcjach układu moczowego. Jego 1% roztwór w wodzie o pH=2,4 ma zdolność rozpuszczania apatytu i ortofosforanu amonowo-magnezowego, dwóch minerałów odpowiedzialnych za powstawanie kamieni podczas umieszczania cewnika w cewce moczowej [166]. Wykazuje też szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego, obejmujące m.in. bakterie gram-dodatnie (np. *Staphylococcus aureus*) i bakterie gram-ujemne (np. *Escherichia coli*).

Badania dotyczące możliwości dalszego zastosowania kwasu migdałowego w medycynie i kosmetologii przeprowadził pod koniec lat 90-tych ubiegłego wieku Taylor [167]. Zainteresował się on dualizmem działania kwasu migdałowego, czyli jego skutecznością jako kosmetyku i silną aktywnością antybakteryjną. Taylor miał na celu wykazanie właściwości odmładzających (przeciwdziałanie starzeniu się skóry) tego kwasu, podobnych do właściwości kwasu glikolowego (najprostszego i jednego z najczęściej stosowanych AHA w kosmetyce) oraz ocenę efektów antybakteryjnych w leczeniu trądzika, a także możliwości zapobiegawczych w infekcjach spowodowanych przez bakterie gram-ujemne, występujących po zabiegach laserowych skóry. W ciągu trzech lat Taylor i jego współpracownicy przebadali ponad 1000 osób z takimi schorzeniami i defektami skóry, jak *dermatoheliosis* (uszkodzenie skóry indukowane promieniowaniem UV, określane często jako fotostarzenie), zaburzenia barwnikowe (hiperpigmentacje) i trądzik pospolity.

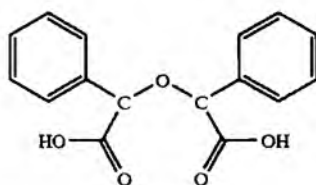
Cząsteczka kwasu migdałowego jest większa od cząsteczki kwasu glikolowego (Rys. 21) i charakteryzuje się niskim $pK=3,41$, które jest niższe od pK kwasu glikolowego, wynoszącego 3,83, co odpowiada za jego większą efektywność. Jego właściwości i doskonała tolerancja sprawiły, że zabieg 50% kwasem migdałowym stał się typowym w grupie osób nie tolerujących zabiegów wykonywanych przy użyciu innych AHA, przede wszystkim kwasu glikolowego. Korzystną cechą kwasu migdałowego jest również prawie całkowity brak

tendencji do wywoływania przebarwień pozapalnych, które nierzadko pojawiają się u osób z ciemną karnacją skóry, poddawanych zabiegom przy użyciu kwasu trójchlorooctowego czy glikolowego. Stąd też coraz częściej peelingi (złuszczenie martwych komórek naskórka) kwasem migdałowym są jednym z elementów terapii różnych przebarwień. Dużą zaletą preparatów z kwasem migdałowym jest tylko niewielkie podrażnienie skóry, co w przypadku terapii trądzika pospolitego ma duże znaczenie [168].



Rys. 21. Wzór strukturalny kwasu glikolowego (kwas hydroksyoctowy).

Pod koniec lat 90-tych XX wieku ogłoszono wyniki badań nad właściwościami polikondensatu kwasu migdałowego (SAMMA) jako środka antykoncepcyjnego oraz substancji leczniczej w metodach zapobiegających chorobom przenoszonym drogą płciową (ang. sexually transmitted diseases, STD). Związek ten otrzymano w wyniku reakcji stężonego kwasu siarkowego (VI) z kwasem *R,S*-(±)-migdałowym [169]. Jego struktura nie jest jeszcze do końca poznana, lecz wiadomo, iż jest to oligomer (Rys. 22).



Rys. 22. Dimer kwasu migdałowego (kwas 2,2'-difenilo-2,2'-oksy-di-octowy) – przypuszczalna struktura chemiczna SAMMA [169].

Działanie antykoncepcyjne SAMMA opiera się na hamowaniu czynności plemników, dodatkowo oligomer ten wykazuje szerokie spektrum zwalczania takich drobnoustrojów, jak:

- *Chlamydia trachomatis*, bakteria odpowiedzialna za choroby układu moczowo-płciowego, poronienia i stany zapalne,
- *Neisseria gonorrhoeae*, poza rzeżączką bakteria ta może powodować zakażenia innych układów – dotyczy to zwłaszcza pacjentów z obniżoną odpornością,
- ludzki wirus niedoboru odporności (ang. human immunodeficiency virus, HIV) - wirus z rodziny retrowirusów, atakuje głównie limfocyty T-pomocnicze, wywołując

zespół nabytego niedoboru odporności (ang. Acquired Immunodeficiency Syndrome lub Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS),

- wirusy opryszczki pospolitej (ang. herpes simplex virus, HSV) - wirusy, należące do rodziny herpeswirusów, będące przyczyną głównie zmian zapalnych na granicy skóry i błony śluzowej (wargi i narządy płciowe), a także rzadziej zapalenia spojówki i rogówki, skóry lub opryszczkowego zapalenia mózgu.

W przypadku HIV, w pierwszej kolejności są atakowane komórki dendrytyczne odgrywające podstawową rolę w pobudzaniu limfocytów (komórki układu odpornościowego, na podstawie ich liczby można stwierdzić, czy w organizmie jest stan zapalny). SAMMA działa hamująco na transmisję wirusa, blokując przekazywanie glikoprotein wchodzących w skład otoczki wirusa z komórki do komórki, a co za tym idzie zmniejsza ich liczbę w organizmie. Dodatkowym atutem tego związku jest niezwykle mała toksyczność, a tym samym wysokie bezpieczeństwo przy stosowaniu [170-173].

W obecnych czasach, kiedy panuje kult młodości, w obliczu globalnych zagrożeń epidemią chorób przenoszonych drogą płciową, kwas *R,S-(±)*-migdałowy oraz jego enancjomery i ich pochodne wydają się spełniać niezwykle ważną rolę zarówno jako prekursorzy leków, jak i bezpośrednie substancje lecznicze. Dodatkowo podane wyżej przykłady dowodzą, iż są to związki nie tylko skuteczne, ale i bezpieczne w działaniu.

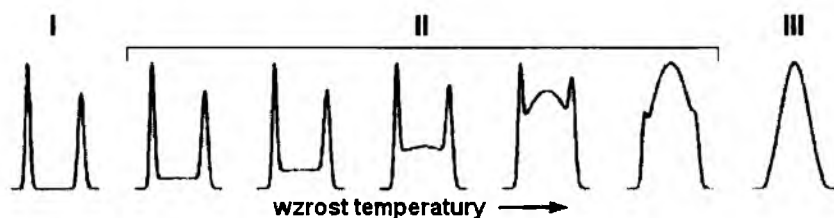
4. Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej i chromatografii gazowej do badania przemian strukturalnych w związkach chiralnych

Enancjomeryzacja i diastereomeryzacja związków chiralnych odgrywają ważną rolę we wszystkich gałęziach chemii, od produkcji leków po chemię supramolekularną. Szybka inwersja cząsteczek enancjomerów w ich antymery może być śledzona przy pomocy spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), natomiast polarymetria, spektroskopia dichroizmu kołowego (CD), czy chromatografia (np. HPLC, czy GC) są częściej używane do badania kinetyki konwersji związków bardziej stabilnych. Jednak wzrastające zapotrzebowanie na wiedzę o optycznej czystości, a tym samym i bezpieczeństwie leków chiralnych doprowadziło do szybkiego rozwoju technik chromatograficznych. W ostatnich latach rozwinęła się szczególna odmiana chromatografii reakcyjnej (ang. reaction chromatography), znana jako chromatografia dynamiczna (ang. dynamic chromatography), która okazała się dobrą alternatywą dla spektroskopii NMR [117,174,175].

4.1. Istota chromatografii dynamicznej

Chromatografia reakcyjna to technika, w której tożsamość składników badanej próbki zmienia się podczas analizy chromatograficznej. Reakcja taka może przebiegać w kolumnie, kiedy to tożsamość chemiczna danego składnika próbki wędrującego przez kolumnę różni się od jego tożsamości w próbce sprzed analizy. Reakcja może też przebiegać na odcinku między kolumną a detektorem, kiedy to składniki próbki są rozdzielane w kolumnie, ale ich tożsamość zmienia się tuż przed wejściem do detektora [176]. Chromatografia dynamiczna szczególnie dotyczy odwracalnych procesów inwersji strukturalnej cząsteczek, zachodzącej w kolumnie chromatograficznej [177].

Koalescencja pików może być wynikiem jednoczesnego rozdziału i inwersji chiralnej enancjomerów zachodzących w kolumnie. Konkurencja między tymi dwoma procesami prowadzi do powstania takiego profilu elucji, który charakteryzuje się plateau między dwoma pikami. Tworzenie się plateau jest skutkiem inwersji chiralnej, a więc skoro szybkość inwersji rośnie wraz z temperaturą, to także i wysokość plateau rośnie wraz z temperaturą (Rys. 23) [117].



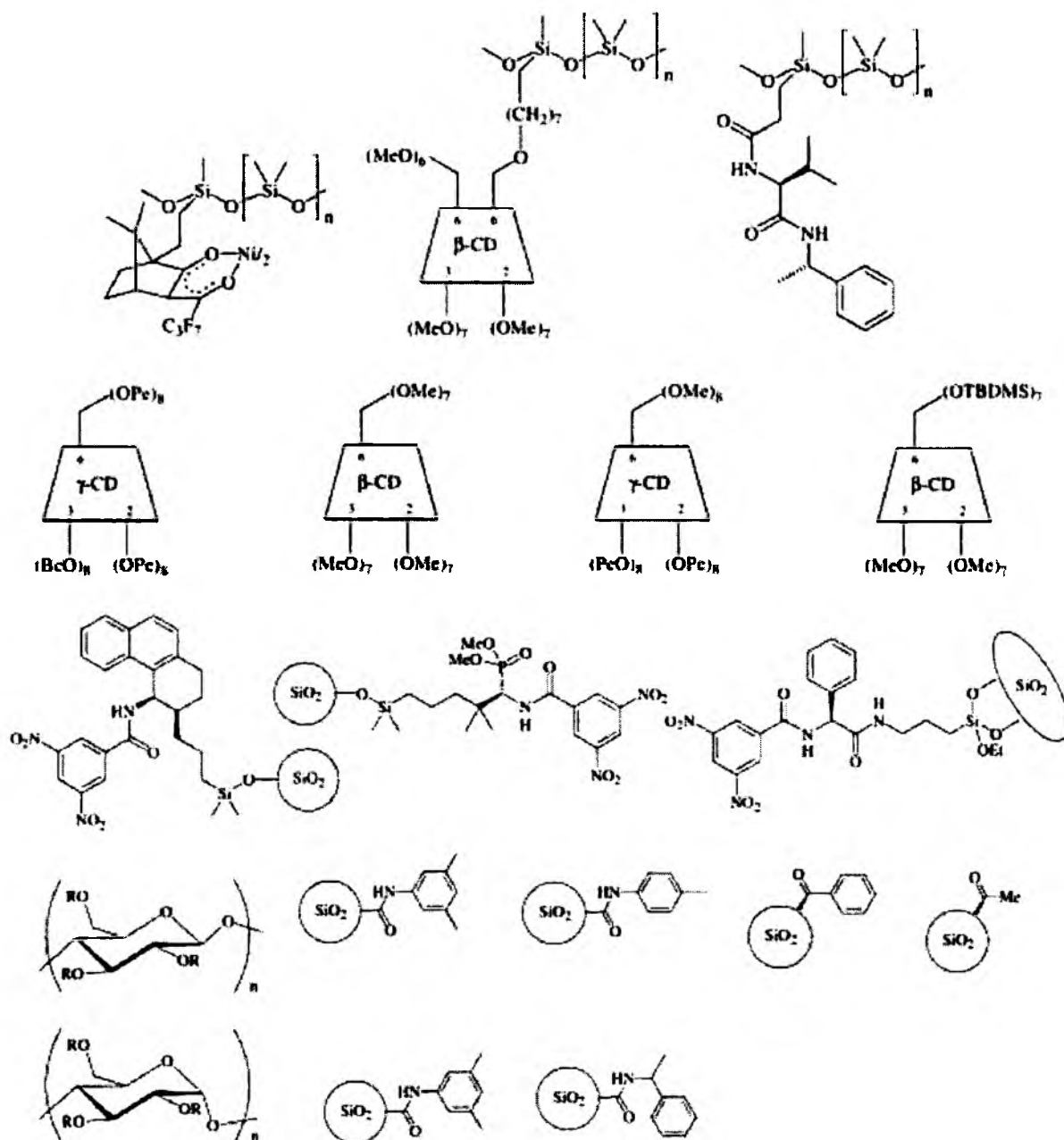
Rys. 23. Temperaturowa zależność powstawania plateau i w konsekwencji koalescencji pików wskutek jednoczesnego rozdzielania i inwersji chiralnej enancjomerów w kolumnie chromatograficznej [117,174].

W ten sposób zależnie od szybkości przebiegu inwersji chiralnej danego związku można oczekiwać trzech różnych responsów chromatograficznych (Rys. 23) [117]:

- I. Jeśli inwersja chiralna jest wolniejsza niż rozdział chromatograficzny oraz jeśli zastosowana chiralna faza stacjonarna „rozdziela” rozdzielane enancjomery, wówczas profil elucji tworzą dwa piki rozdzielone między sobą linią bazową (co można uznać za pełny sukces rozdzielania enancjomerycznego).
- II. Porównywalne szybkości inwersji chiralnej oraz rozdzielania enancjomerycznego generują powstanie plateau między rozdzielonymi pikami.
- III. Jeśli enancjomeryzacja jest znacznie szybsza niż rozdział enancjomeryczny, wówczas powstaje tylko jeden pik wskutek koalescencji dwóch pików pochodzących od dwóch różnych antymerów.

W chromatografii enancjoselektywnej występowanie w otrzymanych profilach elucji koalescencji i formowanie się plateau często zostaje uznane za komplikację podczas procesu separacyjnego. Natomiast chromatografia dynamiczna wykorzystuje te charakterystyczne profile elucji jako narzędzie rozpoznawcze i badawcze dla inwersji strukturalnej, następującej w kolumnie. Z chromatogramów stosunkowo łatwo można uzyskać wszystkie potrzebne parametry do wyznaczenia energetycznej bariery rotacji i szybkości inwersji dla wielu różnych związków chiralnych [177,178], dlatego też chromatografia dynamiczna stała się szeroko stosowaną techniką. W szczególności dynamiczna chromatografia gazowa (DGC) oraz dynamiczna wysokosprawna chromatografia cieczowa (DHPLC) pozwalają wyznaczać szybkości reakcji i parametry aktywacji z wysoką precyzją [117]. Wielkimi zaletami chromatografii dynamicznej jest brak potrzeby preparatywnego rozdzielania enancjomerów (a co za tym idzie, jedynie mała ilość próbki jest zużywana do analizy) oraz to, że achiralne i chiralne zanieczyszczenia nie mają wpływu na pomiary, gdyż zwykle są oddzielane podczas procesu chromatograficznego. Jednakże śledzenie procesu inwersji chiralnej wymaga środowiska chiralnego. Taki wymóg spełniają chiralne fazy stacjonarne (ang. chiral stationary phase, CSP), które są zdolne do rozdzielania enancjomerów w różnych temperaturach,

wywołując przynajmniej częściową inwersję chiralną, co pozwala śledzić jej przebieg [117,174]. CSP są coraz szerzej stosowane w analityce, biochemii, farmacji i farmakologii wypierając chiralne modyfikatory faz ruchomych oraz chiralne czynniki derywatyzujące, charakteryzujące się możliwością zafałszowania wyniku [127]. Enancjoseparacja na chiralnej fazie stacjonarnej polega na różnym podziale antymerów między niechiralną fazę ruchomą a CSP. Do tej grupy należą m.in. pochodne cyklodekstryn, celulozy i amylozy (Rys. 24) [117].

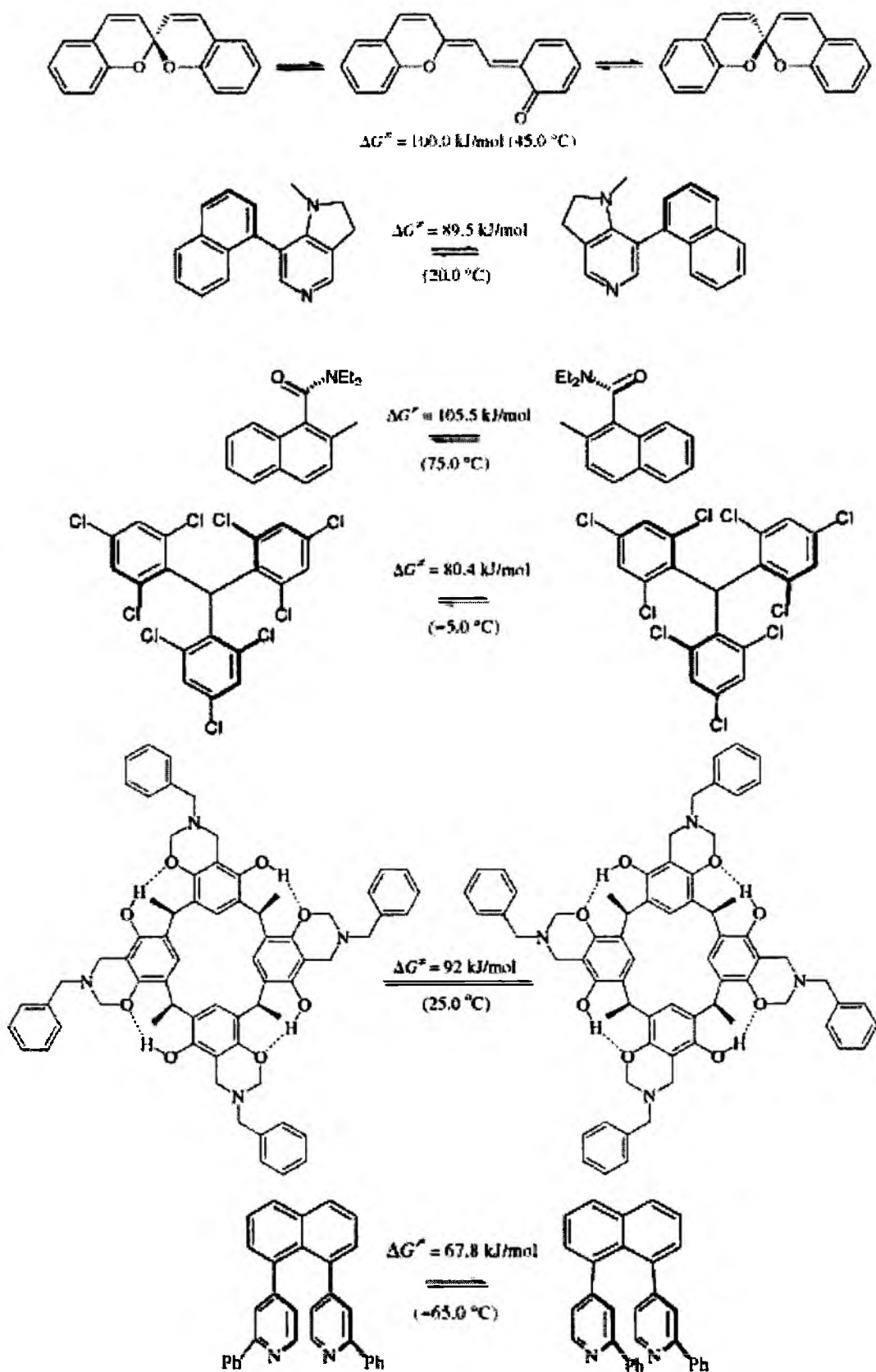


Rys. 24. Struktury związków stanowiących chiralne fazy stacjonarne w chromatografii gazowej i w wysokosprawnej chromatografii cieczowej [117].

4.2. Dynamiczna wysokosprawna chromatografia cieczowa

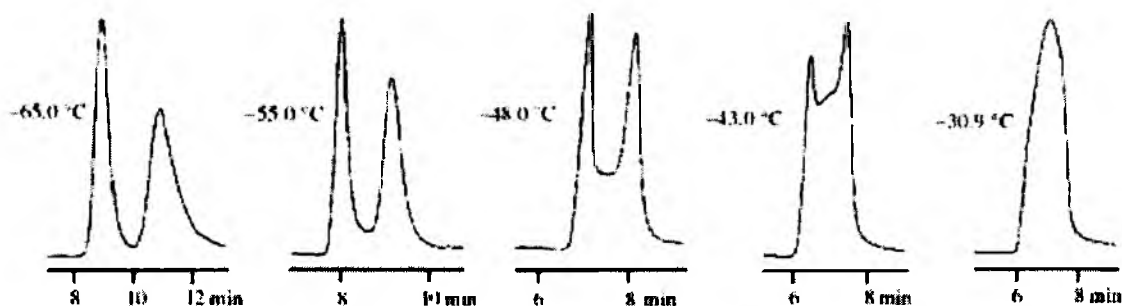
Pierwszy raz wysokosprawną chromatografię cieczową zastosowano do badania kinetyki inwersji strukturalnej w roku 1982, kiedy to Horváth zaobserwował rotację wokół wiązania amidowego w peptydach pochodzących od *L*-proliny [179]. Udało się wówczas wyznaczyć stałe szybkości inwersji izomerów *cis* i *trans* dla dipeptydów [180,181]. Do badania inwersji chiralnej enancjomerów po raz pierwszy techniki HPLC użył Mannschreck w 1989 roku. Używając różnych CSP oraz detekcji fotometrycznej i polarymetrycznej wyznaczył on barierę energetyczną dla otwarcia pierścienia w 2,2'-spirobichromenie (Rys. 25) [182]. Prześledził on także inwersję chiralną antymerów pochodnej naftalenu (Rys. 25) oraz antymerów pochodnej fenantrenu [183,184]. Następnymi byli Veciana i Crespo, którzy zastosowali HPLC do wyznaczenia bariery energetycznej dla inwersji chiralnej tris(2,4,6-trichlorofenilo)metanu (Rys. 25) [185]. Trapp prześledził inwersję chiralną antymerów pochodnej rezorcyny metodą HPLC z użyciem Chiralpaku AD jako fazy stacjonarnej (Rys. 25). Znalazł doskonałą zgodność między parametrami aktywacji wyznaczonymi przy użyciu dynamicznej chromatografii a postulowanym mechanizmem inwersji chiralnej [186].

Cabrera przy użyciu dynamicznej HPLC udowodnił, iż stereochemiczna stabilność i farmakokinetyka takich leków chiralnych, jak oksazepam (działanie nasenne, uspokajające, powodujące zwiótczenie mięśni szkieletowych), chlortalidon (działanie moczopędne), czy prominal (słabe działanie nasenne i silne działanie przeciwdrgawkowe) silnie zależą od rozpuszczalnika i pH [187,188]. Dynamiczna HPLC została również wykorzystana do wytypowania stabilnych konformacyjnie kandydatów na katalizatory dla kinetycznego rozdziału drugorzędowych alkoholi [189,190].



Rys. 25. Reakcje inwersji strukturalnej dla wybranych związków badane przy pomocy dynamicznej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (G^\ddagger oznacza energię aktywacji Gibbsa) [117].

Wolf i Tumambac porównali wyniki badań nad inwersją strukturalną izomerów *syn* i *anty* 1,8-bis(2'-felylo-4'-pirydylo)naftalenu (Rys. 25) otrzymanych metodą dynamicznej HPLC z wynikami otrzymanymi metodą spektroskopii NMR. Obie techniki wykazały doskonałą zgodność pokazując, że konformacyjna stabilność badanego związku wzrasta równomiernie wraz z temperaturą (Rys. 26). Autorzy wykazali również, że połączenie dwóch wymienionych metod pozwala na śledzenie inwersji strukturalnej w zakresie temperatur nawet powyżej 100°C [191,192].



Rys. 26. Formowanie się plateau podczas chromatograficznego rozdzielu izomerów *syn* i *anty* 1,8-bis(2'-felylo-4'-pirydylo)naftalenu w różnych temperaturach [117,192].

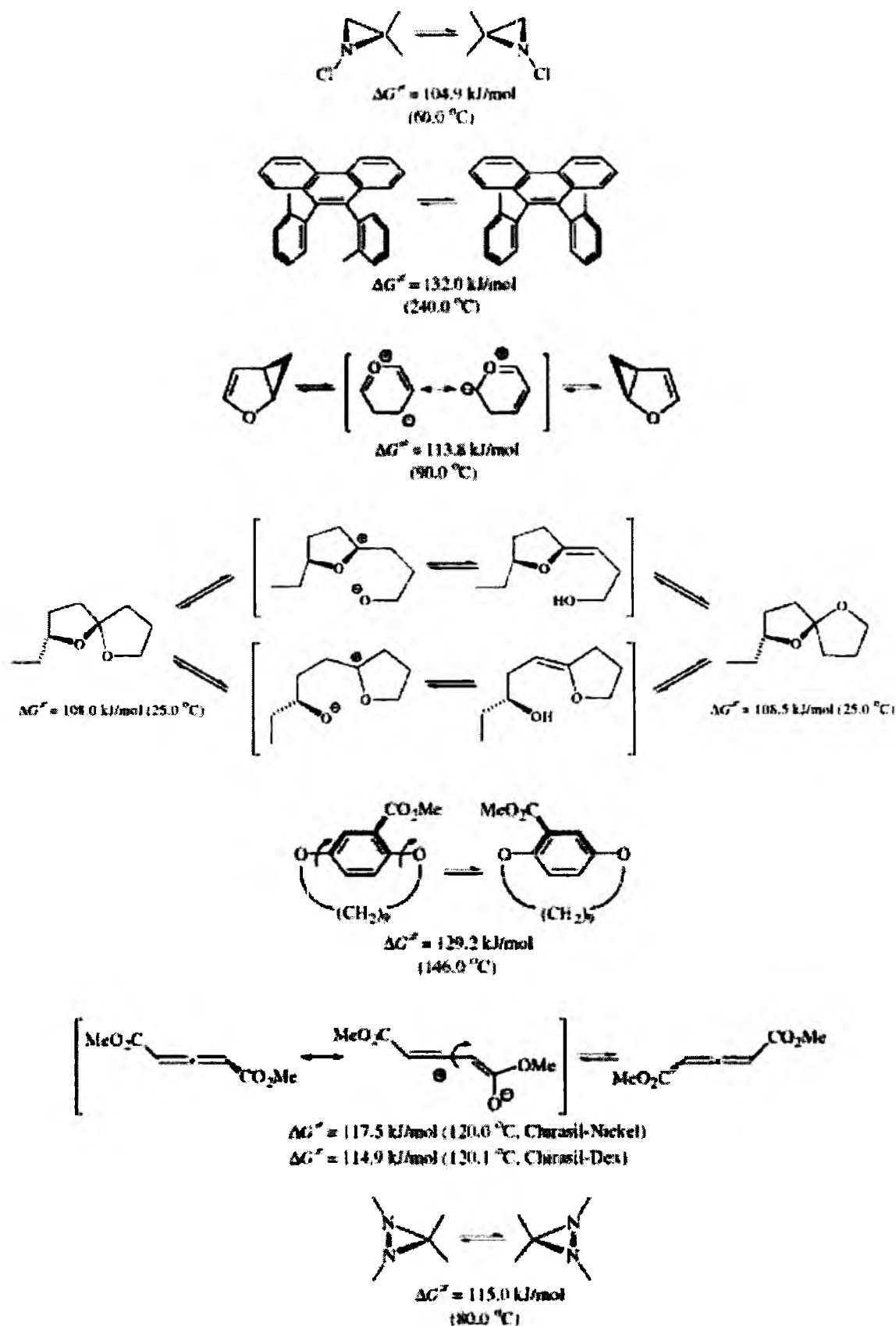
Zbadano również wpływ stosowanych chiralnych faz stacjonarnych na otrzymane metodą dynamicznej HPLC wartości barier energetycznych dla inwersji strukturalnej. Villani wykazał na przykładzie antymerów pochodnych karboksamidów, sulfonów i sulfotlenków, iż użyta do ich rozdzielu (R,S)Whelk-O 1 jako chiralna faza stacjonarna stabilizuje strukturę odpowiednich enancjomerów [193,194]. Do podobnych wniosków doszli Oxelbark i Allenmark badając inwersję chiralną antymerów benzenoditiazolu [195,196]. Otrzymane metodą dynamicznej HPLC wartości parametrów aktywacji były niższe, niż te otrzymane metodą spektroskopii dichroizmu kołowego. Wzrost stabilności strukturalnej związków chiralnych zwykle przypisuje się stabilności kompleksów tworzonych między danym antymerem a chiralną fazą stacjonarną podczas procesu chromatografowania. Nie jest to jednak powszechne zjawisko, ponieważ niektóre z CSP, będące pochodnymi celulozy lub metakrylanu metylu, wykazują właściwości destabilizujące określoną strukturę związków chiralnych [117].

Podsumowując, dynamiczna wysokosprawna chromatografia cieczowa została zaadaptowana do badań nad kinetyką inwersji strukturalnej wielu związków chiralnych. Wartości liczbowe energii aktywacji Gibbsa w tych przemianach zwykle zawierają się w granicach 60-120 kJ/mol (Rys. 25) [117].

4.3. Dynamiczna chromatografia gazowa

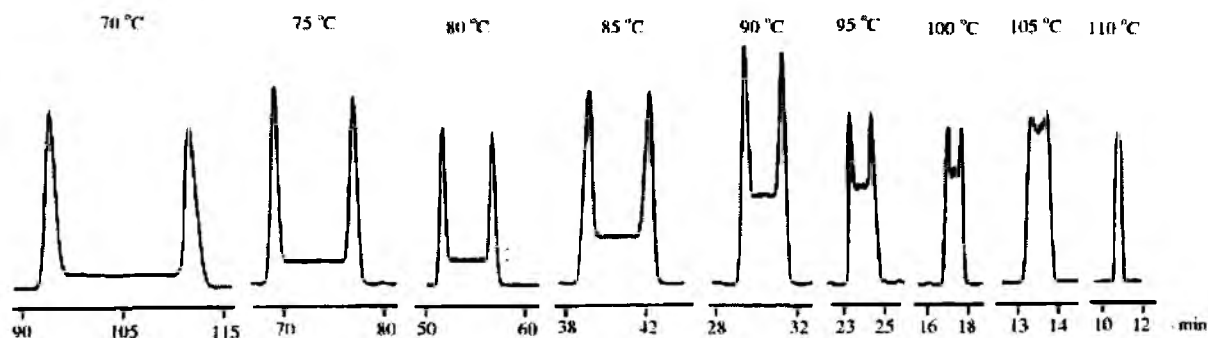
Chromatografia gazowa została przystosowana do badania kinetyki inwersji strukturalnej również w 1982 roku, kiedy to Schurig i Bürkle pracowali nad rozdzielaniem związków racemicznych zawierających azot, takich jak 1-chloro-2,2-dimetyloazydryna (Rys. 27) [197]. W profilach elucji tych związków zaobserwowali oni tworzenie się plateau, wyznaczyli więc parametry aktywacji dla inwersji strukturalnej antymerów tych związków [198]. Marriott i Lai zastosowali chromatografię gazową do badania inwersji strukturalnej izomerów *syn* i *anty* pochodnych antracenu i fenantrenu (Rys. 27) [199]. Klärner wyznaczył barierę aktywacji dla inwersji chiralnej antymerów homofuranu przy pomocy chromatografii gazowej, opracowując przy okazji mechanizm badanego procesu (Rys. 27). Porównane przez niego wyniki otrzymane technikami dynamicznej GC i polarymetrii wykazały doskonałą zgodność [200,201].

Hochmuth i König badali inwersję strukturalną izomerów pochodnych [10]-, [11]- i [12]paracyklofanów [202,203]. Odkryli oni, iż [10]paracyklofany nie ulegają przemianom strukturalnym podczas procesu chromatografowania nawet w temperaturze 170°C, natomiast [12]paracyklofany zachowują się zupełnie odmiennie, ulegając bardzo szybko (już przy 40°C) inwersji strukturalnej na skali czasowej rejestrowania chromatogramów gazowych. Jak można było oczekiwać, [11]paracyklofany, jako jedyne spośród rozpatrywanych paracyklofanów, okazały się odpowiednie do badania inwersji swoich atropoizomerów (Rys. 27). Trapp i Schurig na przykładzie chalkogranu (ważny feromon u chrząszczy) prześledzili reakcję epimeryzacji metodą dynamicznej GC (Rys. 27) [204].



Rys. 27. Reakcje inwersji strukturalnej dla wybranych związków badane przy pomocy dynamicznej chromatografii gazowej (G^\ddagger oznacza energię aktywacji Gibbsa) [117].

Grupa Schuriga wyznaczyła parametry aktywacji dla inwersji antymerów kilku pochodnych diazyryny i pochodnych allenu (Rys. 27), przy czym zauważyli oni, że również w przypadku chromatografii gazowej stosowane fazy stacjonarne, szczególnie te pochodzące od cyklodekstryn, stabilizują lub destabilizują strukturę badanych związków chiralnych [205-207]. Przykładowo szybkość oraz bariera aktywacji inwersji dla 1,2,3,4-tetrametylodiazyryny wyznaczona podczas chromatografowania na fazie stacjonarnej Chirasil-Dex są odpowiednio wyższa i niższa w porównaniu do wartości otrzymanych z symulacji komputerowej. Grupa Wolfa badała kilka bifenyli w celu wyznaczenia ich energetycznych barier rotacji metodą chromatografii gazowej z użyciem modyfikowanych cyklodekstryn jako chiralnych faz stacjonarnych (Rys. 28) [208]. Chociaż otrzymane wartości pokrywały się z tymi otrzymanymi metodą polarymetrii, to odkryto, że CSP w niewielkim stopniu zaburzają te wartości. Na przykładzie 2,2'-diizopropylobifenyłu wykazano, iż pochodna β -cyklodekstryny jako faza stacjonarna wywiera wpływ na obniżenie bariery aktywacji inwersji strukturalnej dla atropizomerów tego związku, natomiast pochodne γ -cyklodekstryny wpływają na jej podwyższenie.

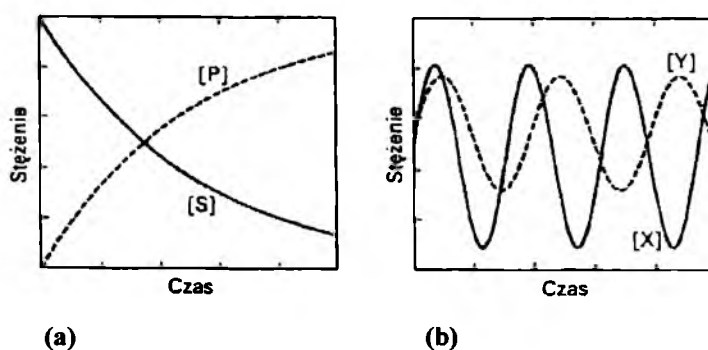


Rys. 28. Formowanie się plateau podczas chromatograficznego rozdzielania izomerów 2-izopropyl-2'-trifluorometylibifenyłu w różnych temperaturach [117].

Podsumowując, dynamiczna chromatografia gazowa została zaadaptowana do badań nad kinetyką inwersji strukturalnej wielu związków chiralnych. Wartości liczbowe energii aktywacji Gibbsa w tych przemianach zawierają się w granicach 100-150 kJ/mol (Rys. 27) [117].

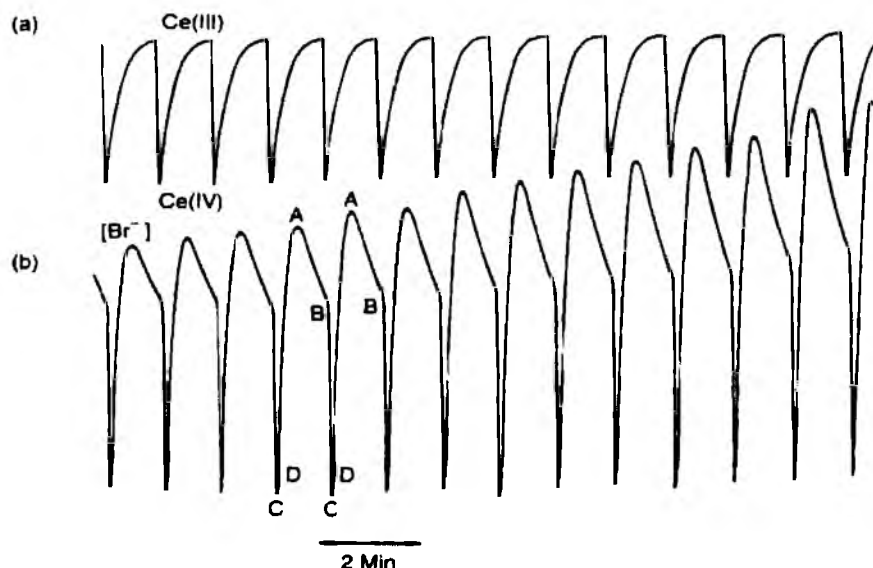
5. Brukselator – wybrany model chemicznych reakcji oscylacyjnych

W typowej reakcji chemicznej stężenia substratów maleją z upływem czasu, a stężenia produktów rosną, natomiast reakcje oscylacyjne to procesy, w trakcie których niektóre biorące w nich udział reagenty (konkretnie ich stężenia) ulegają niemonotonicznym zmianom w czasie, po drodze przekształcając się w substancje przejściowe między substratami a produktami (Rys. 29). Znaczenie reakcji oscylacyjnych trudno przecenić, ponieważ stanowią one m.in. jedną z zasadniczych cech żywych organizmów [209].



Rys. 29. Porównanie czasowych zmian stężeń: (a) substratu ($[S]$) i produktu ($[P]$) w typowej reakcji chemicznej i (b) substancji przejściowych ($[X]$, $[Y]$) w reakcji oscylacyjnej [210].

Pierwsze, sięgające XIX wieku [211], doświadczalne obserwacje procesów będących reakcjami oscylacyjnymi dotyczyły układów heterogenicznych, takich jak „pulsujące rtęciowe serce”, oscylacje prądu elektrycznego w czasie elektrolitycznego utleniania metali, czy też okresowe wytrącanie osadów w żelach. Nieco później zaproponowano także proste mechanizmy dla reakcji oscylacyjnych przebiegających w układach homogenicznych. Należy do nich m.in. słynna reakcja Biełousowa-Żabotyńskiego, polegająca na utlenianiu kwasu karboksylowego przy pomocy bromianu w obecności pary jonów na dwóch różnych stopniach utlenienia jako katalitycznego układu redoks (Rys. 30) [212-215].



Rys. 30. Wykres przedstawiający typowy wynik eksperymentalny w reakcji Bielousowa-Żabotyńskiego; oscylacje przedstawione jako potencjał (a) elektrody platynowej i (b) elektrody bromkowej (obie w odniesieniu do kalomelu) [215].

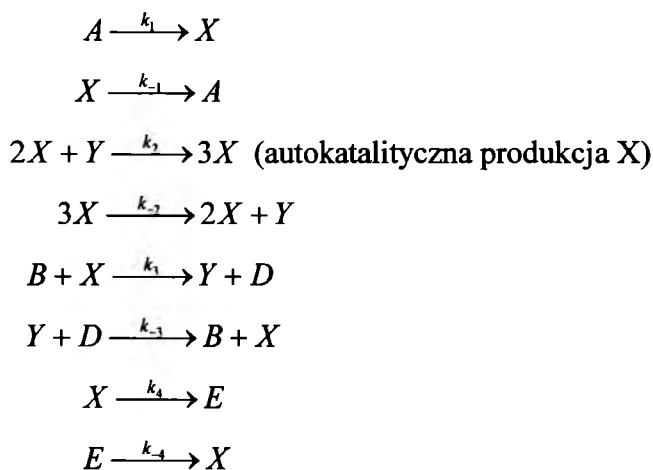
Reakcje oscylacyjne należą zwykle do reakcji bardzo złożonych i nie do końca szczegółowo poznanych. Dlatego też nie jest sprawą prostą przedstawienie matematycznego opisu zmian zachodzących w badanym układzie. Dodatkowo procesy fizykochemiczne muszą spełniać określone kryteria, aby ich przebieg mógł posiadać charakter oscylacyjny. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, kryteria te są następujące [210]:

- I. Parametry opisujące układ muszą być odległe od stanu równowagi. Muszą one mieć dużą wartość siły napędowej reakcji, której miarą w warunkach izotermiczno-izochorycznych lub izotermiczno-izobarycznych jest ujemna swobodna energia Helmholtza (ΔF) lub swobodna entalpia reakcji Gibbsa (ΔG) ($F = E - TS$ oraz $G = H - TS$, gdzie E - energią wewnętrzną, H - entalpią, T - temperaturą, S - entropią).
- II. Musi być spełniona zasada nieliniowości charakterystyki dynamicznej układu. Chodzi o to, by równania kinetyczne reakcji były nieliniowe, tzn. aby zawierały człony, wyrażające np. iloczyn stężeń dwóch lub więcej form przejściowych, lub stężenie pojedynczej formy podniesione do potęgi różnej od jedności.
- III. Pożądane jest, aby w mechanizmie reakcji istniały etapy sprzężeń zwrotnych (pętle), niekiedy o odpowiednio opóźnionym działaniu.

Brukselator jest jednym z bardziej znanych abstrakcyjnych modeli procesów oscylacyjnych w układach dyssypatywnych (układy takie charakteryzują się dalekimi od stanu równowagi stabilnymi stanami stacjonarnymi, których powstaniu towarzyszy wzrost uporządkowania, a do ich utrzymania niezbędna jest ciągła nieodwracalna wymiana energii z otoczeniem). Nazwa tego modelu wywodzi się od tzw. szkoły brukselskiej, czyli od zespołu pracującego pod kierunkiem Prigogine’a. Brukselator jest oparty na pionierskiej pracy Turinga z 1952 roku [216], a został zademonstrowany po raz pierwszy w 1968 roku przez Prigogine’a i Lefevera (nazwę nadał mu Tyson w 1973), jako model opisujący homogeniczne oscylacje. Jest on o tyle ważnym modelem, że pokazuje samoorganizację występującą w mechanizmie rzeczywistej reakcji chemicznej [217]. Za swój wkład w badania nad układami nierównowagowymi Ilya Prigogine został w 1977 roku uhonorowany nagrodą Nobla [218].

5.1. Brukselator z homogenicznym rozkładem reagentów [210,218]

W swojej pionierskiej pracy Turing zawarł następujący mechanizm reakcji odwracalnych:



sumarycznie $A + B \leftrightarrow D + E$

(1)

Brukselator upraszcza model Turinga w ten sposób, że zakłada nieodwracalność wszystkich etapów, a ich stałe szybkości (k_1, k_2, k_3, k_4) przyjmuje za równe jedności:



Przedstawiony model operuje dwiema formami przejściowymi (X i Y), ale wśród reakcji elementarnych pojawia się etap dwucząsteczkowy i etap trózcząsteczkowy. Bezpośrednim skutkiem wyższej rzędowości reakcji elementarnych jest to, że w równaniach kinetycznych pojawiają się człony o silnej nieliniowości. Jeśli założymy, że stężenia form A, B, D i E mechanizmu (2) są stałe w czasie, to zmiany stężeń substancji przejściowych X i Y można opisać przy pomocy następującego układu równań różniczkowych:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[X]}{dt} &= [A] + [X]^2[Y] - ([B] + 1)[X] \\
 \frac{d[Y]}{dt} &= [B][X] - [X]^2[Y]
 \end{aligned} \tag{3}$$

W wyniku przyrównania do zera wartości lewych stron powyższych równań otrzymujemy parametry stanu stacjonarnego:

$$\begin{cases} [A] + [X]_{st}^2[Y]_{st} - ([B] + 1)[X]_{st} = 0 \\ [B][X]_{st} - [X]_{st}^2[Y]_{st} = 0 \end{cases} \tag{4}$$

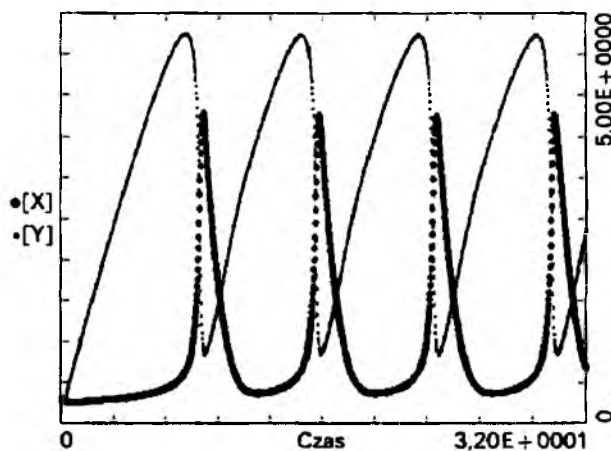
Rozwiązując układ równań (4) dochodzimy do wniosku, że Brukselator wykazuje tylko jeden stan stacjonarny, określony przez stężenia substratów:

$$\begin{aligned}
 [X]_{st} &= [A] \\
 [Y]_{st} &= [B]/[A]
 \end{aligned} \tag{5}$$

Stan ten jest stabilny tylko wówczas, gdy spełniona jest następująca relacja między stężeniami A i B:

$$[B] < [A]^2 + 1 \quad (6)$$

Jeśli zmiana stężenia B prowadzi do osiągnięcia wartości krytycznej $[B]_{kr} = [A]^2 + 1$, to wówczas następuje bifurkacja Hopfa (utrata stabilności przez stan stacjonarny). Zatem jeśli w praktyce spełniona jest zależność $[B] > [A]^2 + 1$, to wówczas obserwuje się zupełnie nowe zachowanie układu – stabilne oscylacje stężeń X i Y (Rys. 31).



Rys. 31. Symulacja komputerowa przebiegów w czasie stężeń substancji przejściowych ([X], [Y]) w modelu Brukselatora [210].

5.2. Brukselator z dyfuzją [210,218]

Opisany powyżej mechanizm dotyczył wyłącznie układów homogenicznych, czyli pozbawionych gradientów stężeń, gdzie każde z rozważanych stężeń było wyłącznie funkcją czasu, o przebiegu jednakowym w każdym elemencie przestrzennym roztworu. Inaczej przedstawia się sytuacja, jeśli założymy heterogeniczny rozkład substancji w przestrzeni (x, y, z), co sprawia, że stężenia są funkcją wielu zmiennych: $C(x, y, z, t)$. Sprzężenie kinetyki reakcji chemicznych z dyfuzją reagentów może prowadzić do zdestabilizowania homogenicznego stanu stacjonarnego i powstania uporządkowań przestrzennych, tj. stacjonarnych i niestacjonarnych fal chemicznych. Struktury stacjonarne są nazywane strukturami Turinga, a prowadząca do nich utrata stabilności jednorodnego stanu stacjonarnego – bifurkacją Turinga.

Uwzględniając w równaniach kinetycznych (3) dyfuzję, należy do nich dodać człon wynikający z II prawa Ficka (odnoszącego się do sytuacji, gdy strumień dyfuzji zmienia się lokalnie w czasie). Rozpatrując najprostszy przypadek dyfuzji zależnej od jednej współrzędnej przestrzennej r , układ równań przyjmuje następującą postać:

$$\begin{cases} \frac{\partial[X]}{\partial t} = [A] + [X]^2[Y] - ([B] + 1)[X] + D_X \frac{\partial^2[X]}{\partial r^2} \\ \frac{\partial[Y]}{\partial t} = [B][X] - [X]^2[Y] + D_Y \frac{\partial^2[Y]}{\partial r^2} \end{cases} \quad (7)$$

gdzie D_X i D_Y oznaczają współczynniki dyfuzji form X i Y, a pochodne przybierają charakter cząstkowy, uwzględniający zależność $[X]$ i $[Y]$ od więcej niż jednej zmiennej. Układ równań (7) można rozwiązać jedynie numerycznie, co z kolei wymaga określenia warunków brzegowych (ograniczeń narzuconych na zachowanie form X i Y na krańcach reaktora). Jeśli założymy, że substancje X i Y nie opuszczają reaktora, to wtedy otrzymujemy zerowe gradienty stężeń X i Y na granicach obszaru reaktora, czyli dla $r = 0$ i $r = 1$.

$$\left[\frac{d[X]}{dr} \right]_{r=0} = \left[\frac{d[Y]}{dr} \right]_{r=0} = \left[\frac{d[X]}{dr} \right]_{r=1} = \left[\frac{d[Y]}{dr} \right]_{r=1} = 0 \quad (8)$$

Następnie stosując liniową analizę stabilności układu (7) definiuje się nowe zmienne γ i ϑ , określające różnicę między wartościami aktualnymi $[X]$ i $[Y]$, a ich wartościami w stanie stacjonarnym:

$$\begin{aligned} \gamma &= [X] - [X]_{st} = [X] - [A] \\ \vartheta &= [Y] - [Y]_{st} = [Y] - [B]/[A] \end{aligned} \quad (9)$$

Uwzględniając nowe zmienne, układ równań (7) przyjmuje postać:

$$\begin{cases} \frac{\partial\gamma}{\partial t} = \gamma^2\vartheta + \frac{[B]}{[A]}\gamma^2 + 2[A]\gamma\vartheta + [B]\gamma - \gamma + D_X \frac{\partial^2\gamma}{\partial r^2} \\ \frac{\partial\vartheta}{\partial t} = -\gamma^2\vartheta - 2[A]\gamma\vartheta - \frac{[B]}{[A]}\gamma^2 - [B]\gamma - [A]^2\vartheta + D_Y \frac{\partial^2\vartheta}{\partial r^2} \end{cases} \quad (10)$$

Wprowadzenie linearyzacji prowadzi do otrzymania równań opisujących stan stacjonarny:

$$\begin{aligned}\frac{\partial \gamma}{\partial t} &= ([B]-1)\gamma + [A]^2 \mathcal{G} + D_x \frac{\partial^2 \gamma}{\partial r^2} = 0 \\ \frac{\partial \mathcal{G}}{\partial t} &= -[B]\gamma - [A]^2 \mathcal{G} + D_y \frac{\partial^2 \mathcal{G}}{\partial r^2} = 0\end{aligned}\tag{11}$$

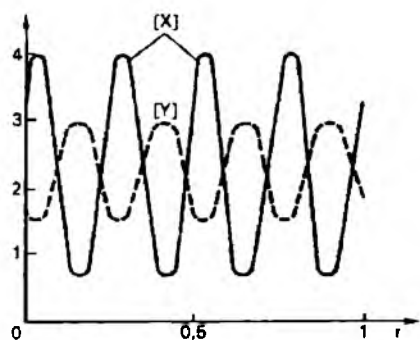
Nowe zmienne γ , \mathcal{G} zachowują takie same warunki brzegowe, jak zmienne oryginalne $[X]$ i $[Y]$. Dodatkowo zaburzenia stanu stacjonarnego powinny przyjmować wartość zerową na granicy obszaru: $\gamma(r = 0, t) = \mathcal{G}(r = 0, t) = \gamma(r = 1, t) = \mathcal{G}(r = 1, t) = 0$. Rozwiązanie ogólne (γ, \mathcal{G}) układu (11) dla takich warunków brzegowych przyjmuje postać: $e^{\omega t} \cos[n\pi r/l]$, gdzie $n = 0, 1, 2, \dots$. Jeśli podstawimy te wyrażenia do układu (11), to wówczas otrzymamy następujący układ równań algebraicznych:

$$\begin{cases} \left[\omega - [B] + 1 + D_x \frac{n^2 \pi^2}{l^2} \right] \gamma - [A]^2 \mathcal{G} = 0 \\ [B]\gamma + \left[\omega + [A]^2 + D_y \frac{n^2 \pi^2}{l^2} \right] \mathcal{G} = 0 \end{cases}\tag{12}$$

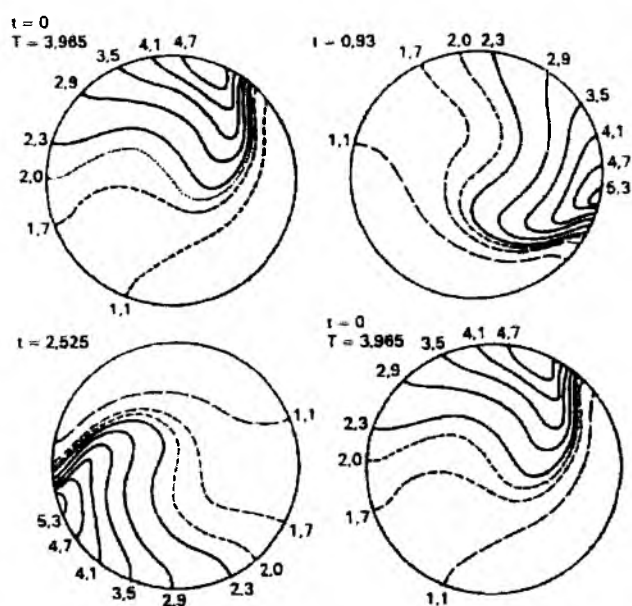
Układ ten ma niezerowe rozwiązania pod warunkiem zerowej wartości wyznacznika. Utrata stabilności stacjonarnych rozwiązań Brukselatora z dyfuzją wymaga, aby $[B] \geq 1 + [A]^2 + (D_x + D_y) \frac{n^2 \pi^2}{l^2}$, co jest rozszerzeniem $[B] > [A]^2 + 1$.

Brukselator z dyfuzją umożliwia wymodelowanie następujących rodzajów zachowania układu:

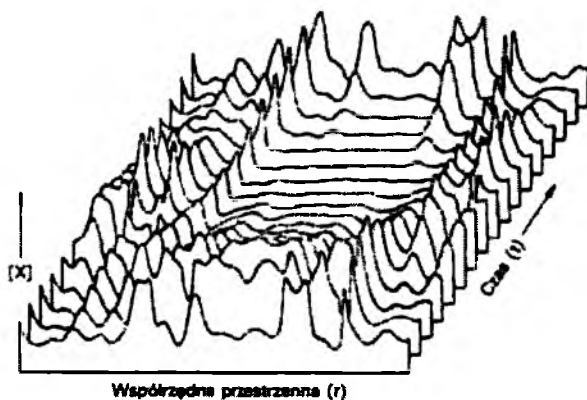
- Powstawania stabilnego cyklu granicznego, czyli synchronicznych zmian stężeń X i Y w całej przestrzeni reaktora.
- Struktur Turinga, czyli stacjonarnego periodycznego rozkładu stężeń X i Y w reaktorze (Rys 32).
- Periodycznych frontów falowych (Rys. 33).
- Chaotycznych frontów falowych (Rys. 34).



Rys. 32. Przykładowa struktura Turinga w modelu Brukselatora [210,219].

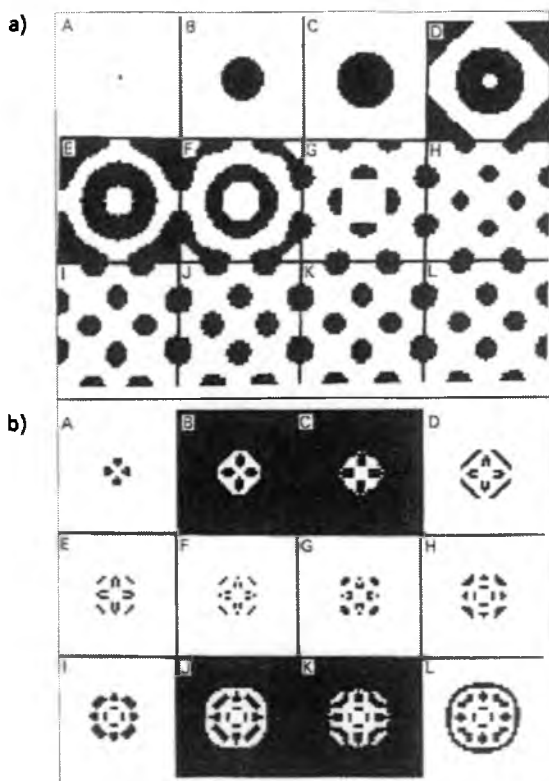


Rys. 33. Kształty wędrujących frontów falowych w modelu Brukselatora (linie ciągłe – stężenia X powyżej stanu stacjonarnego; linie przerywane – stężenia X poniżej stanu stacjonarnego; T – okres) [210].



Rys. 34. Chaotyczne profile zależności stężenia X od czasu i współrzędnej przestrzennej w modelu Brukselatora [210,220].

Brukselator może być również wykorzystywany do modelowania struktur przestrzennych, np. na dwuwymiarowej szachownicy, której każde pole zawiera osobny oscylator sprzężony dyfuzyjnie z oscylatorami sąsiednimi. Po wprowadzeniu lokalnego zaburzenia stężenia jednej z form, zachowanie takich układów złożonych ze sprzężonych komórek oscylacyjnych może wykazywać istotne podobieństwo do schematu podziału komórek biologicznych. Układ sprzężonych w ten sposób oscylatorów może prowadzić do rozwoju stacjonarnych i niestacjonarnych struktur „kropkowych” oraz „mozaikowych” (Rys. 35) [221].



Rys. 35. Rozwój niestacjonarnych struktur a) kropkowych i b) mozaikowych w czasie dla układu 41×41 komórek z Brukselatorami o różnym stopniu sprzężenia [210,221].

6. Cel pracy

Szczegółowym celem badawczym niniejszej rozprawy doktorskiej było:

- I. Przebadanie wybranych profenów jako asymetrycznych pochodnych kwasu propionowego pod kątem ich zdolności do ulegania samorzutnej oscylacyjnej inwersji chiralnej *in vitro*. Do badań tych wytypowano ketoprofen i flurbiprofen. Wybranymi technikami badawczymi były tutaj chiralna chromatografia cienkowarstwowa i polarymetria.
- II. Stwierdzenie, czy i w jaki sposób długość łańcucha węglowego decyduje o zachodzeniu samorzutnej oscylacyjnej inwersji chiralnej *in vitro* kwasów karboksylowych. W tym celu do prowadzonych badań wybrano odpowiednie asymetryczne pochodne kwasu octowego, czyli związki o dwóch atomach węgla w łańcuchu. Wytypowanymi związkami zostały α -fenyloglicyna i kwas migdałowy. Jako technik badawczych użyto chromatografię cienkowarstwową i polarymetrię.
- III. Pogłębienie dotychczasowego zrozumienia szczegółowego mechanizmu reakcji elementarnych, składających się na zachodzący *in vitro* proces samorzutnej oscylacyjnej inwersji chiralnej oraz oscylacyjnej polikondensacji wybranych asymetrycznych kwasów karboksylowych z grup profenów, aminokwasów i hydroksykwasów przechowywanych w roztworach wodnych i niewodnych. Wytypowanymi do tego technikami badawczymi były achiralna wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją na matrycy fotodiodowej oraz ze spektrometrią mas, a także spektroskopia ^{13}C NMR.

7. Część doświadczalna

7.1. Odczynniki i materiały

W badaniach, będących przedmiotem niniejszej pracy, wykorzystano odczynniki chemiczne i materiały przedstawione w Tabelach 2-5.

Tabela 2. Ogólna charakterystyka badanych analitów.

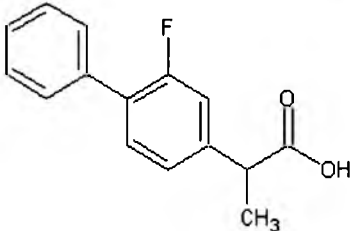
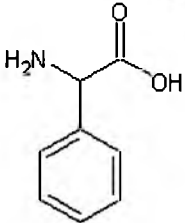
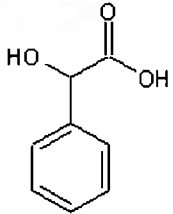
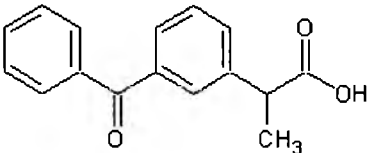
Analit	Wzór chemiczny	Numer katalogowy	Stopień czystości	Producent
<i>S</i> -(+)-Flurbiprofen <i>R</i> -(-)-Flurbiprofen		545740-1G 482641-500MG	≥98%	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
<i>L</i> -(+)- α -Fenyloglicyna <i>D</i> -(-)- α -Fenyloglicyna		237647 P25485	≥99%	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Kwas <i>S</i> -(+)-migdałowy Kwas <i>R</i> -(-)-migdałowy		M2004 154210	≥99%	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
<i>R,S</i> -(±)-Ketoprofen <i>S</i> -(+)-Ketoprofen		K1751-5G 471909-1G	≥98%	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

Tabela 3. Ogólna charakterystyka cieczy stosowanych jako rozpuszczalniki analitów i/lub jako fazy ruchome w chromatografii cieczowej.

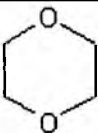
Związek chemiczny	Wzór chemiczny	Stopień czystości	Producent
Acetonitryl	CH ₃ CN	≥99,9%	Merck, Darmstadt, Niemcy
Metanol	CH ₃ OH	≥99,8%	Merck, Darmstadt, Niemcy
Etanol	C ₂ H ₅ OH	≥99,9%	Merck, Darmstadt, Niemcy
n-Butanol	C ₄ H ₁₁ OH	≥99,9%	Fluka, Buchs, Szwajcaria
Dioksan		≥99,8%	Merck, Darmstadt, Niemcy
Woda	H ₂ O	redestylowana	Laboratorium Uniwersytetu Śląskiego, Katowice, Polska
Lodowaty kwas octowy	CH ₃ COOH	≥99,5%	POCH, Gliwice, Polska
Roztwór buforowy, pH=9	H ₃ BO ₃ , KCl, NaOH	±0,05 (20°C)	POCH, Gliwice, Polska
Zdeuterowany dichlorometan	CDCl ₃	≥99,8%	Armar Chemicals, Döttingen, Szwajcaria

Tabela 4. Ogólna charakterystyka ciał stałych stosowanych do sporządzenia roztworów użytych w badaniach.

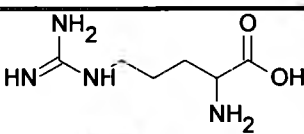
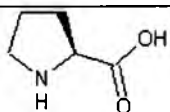
Związek chemiczny	Wzór chemiczny	Stopień czystości	Producent
<i>L</i> -Arginina		≥99%	Merck, Darmstadt, Niemcy
<i>L</i> -Prolina		≥99%	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Pięciowodny siarczan(IV) miedzi(II)	CuSO ₄ ×5H ₂ O	≥98%	POCH, Gliwice, Polska
Dwuwodny octan miedzi(II)	Cu(CH ₃ COO) ₂ ×5H ₂ O	≥99%	POCH, Gliwice, Polska
Wodorotlenek sodu	NaOH	≥98%	POCH, Gliwice, Polska

Tabela 5. Podstawowa charakterystyka materiałów stosowanych jako fazy stacjonarne w chromatografii cieczowej.

Faza stacjonarna	Rodzaj chromatografii	Numer katalogowy	Wymiary kolumny i średnica ziarna	Producent
Żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ (gotowe płytki szklane)	TLC	1.05715	-	Merck, Darmstadt, Niemcy
LiChrospher® 100, RP-18	HPLC	1.50983	250 mm × 4,6 mm 5 µm	Merck, Darmstadt, Niemcy
Relselute C-18	HPLC	1215-9017	250 mm × 4,6 mm 5 µm	Varian, Harbor City, CA, USA
Hypersil GOLD, C-18	HPLC	0694830N	250 mm × 4,6 mm 5 µm	Thermo Scientific, Wltham, MA, USA
Pursuit 5 C18	HPLC	A3000250 C046	250 mm × 4,6 mm 5 µm	Varian, Harbor City, CA, USA
Pursuit X R _S 3-C18	HPLC	A6001050 C020	50 mm × 2,0 mm 5 µm	Varian, Harbor City, CA, USA

7.2. Sprzęt i aparatura

Poniżej przedstawiono wykaz sprzętu użytego podczas przeprowadzonych w niniejszej pracy badań wybranymi technikami analitycznymi:

- Densytometr CD 60 firmy Desaga (Heidelberg, Niemcy), wyposażony w program ProQuant firmy Desaga, współpracujący z systemem Windows.
- Automatyczny aplikator próbek do płytek chromatograficznych (model AS-30) produkcji firmy Desaga (Heidelberg, Niemcy);
- Chromatograf HPLC firmy GynkoteK (Germering, Niemcy):
 - Autosampler: GynkoteK Gina 50;
 - Pompa: GynkoteK typ P 580A LPG;
 - Detektor: GynkoteK DAD UVD 340U;
 - Program do akwizycji i obróbki danych: Chromeleon.Dionex wersja 6.40;
 - Termostat: Varian Pro Star 510;

- Chromatograf HPLC model 920 firmy Varian (Harbor City, CA, USA):
 - Autosampler;
 - Pompa gradientowa;
 - Detektor z matrycą fotodiodową (DAD);
 - Program do akwizycji i obróbki danych: Galaxie;
- Chromatograf LC-MS System Varian firmy Varian (Palo Alto, CA, USA):
 - Pompa: Varian ProStar;
 - Detektor: Spektrometr masowy Varian 500-MS-ESI;
 - Program do akwizycji i obróbki danych: Varian MS Workstation wersja 6.9.1;
- Polarymetr Polamat A firmy Carl Zeiss (Jena, Niemcy);
- Polarymetr 341 firmy Perkin-Elmer (Wellesley, MA, USA);
- Spektrometr NMR 400 Hz firmy Bruker Avance (Billerica, USA);
- Mikroskop polaryzacyjny Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokio, Japonia);
- Aparat cyfrowy Nikon Coolpix 990 (Nikon Corporation, Tokio, Japonia);
- Video densytometr Chromimage firmy AR2i (Le Plessis Robinson, Francja);
- Komora chromatograficzna wg Stahla, produkcji firmy Camag (Muttentz, Szwajcaria);
- Waga laboratoryjna Scaltec (model SBC 31) produkcji firmy Scaltec Instruments (Heiligenstadt, Niemcy);
- Kalibrowane kapilary do nanoszenia próbek stosowane w chromatografii cienkowarstwowej produkcji firmy Camag (Muttentz, Szwajcaria);
- Drobny sprzęt laboratoryjny (kolby miarowe, pipety, szkiełka mikroskopowe, termometr).

7.3. Metodyka prowadzonych badań

7.3.1. Technika chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

W przeprowadzonych eksperymentach zastosowano różne układy chromatograficzne dla poszczególnych analitów, tj. *S*-(+)-flurbiprofenu, *R*-(-)-flurbiprofenu, *L*-(+)- α -fenyloglicyny, *D*-(-)- α -fenyloglicyny, kwasu *S*-(+)-migdałowego, kwasu *R*-(-)-migdałowego, *S*-(+)-ketoprofenu i *R,S*-(\pm)-ketoprofenu, chromatografowanych pojedynczo. Warunki rozdziału dla wybranych układów TLC zaczerpnięto z publikacji [222-224]. Tabela 6 przedstawia ogólną charakterystykę zastosowanych układów chromatograficznych. Prócz czystych optycznie antymerów poszczególnych związków do badań w przypadku flurbiprofenu, α -fenyloglicyny i kwasu migdałowego przygotowywano również racematy przez zmieszanie równomolowych ilości ich enancjomerów. Do badań użyto także skalematów α -fenyloglicyny sporządzonych przez zmieszanie optycznie czystych antymerów *L*-(+) i *D*-(-) w stosunkach molowych: 0,75:0,25 i 0,25:0,75.

Przed przystąpieniem do nanoszenia analitów, płytki chromatograficzne przygotowywano poprzez ich przedwstępne rozwijanie w roztworze zawierającym metanol i wodę w stosunku objętościowym 9:1. Następnie płytki suszono w temperaturze pokojowej przez okres 3 godzin. Przedwstępne rozwijanie płytek miało na celu usunięcie z powierzchni żelu krzemionkowego ewentualnych zaadsorbowanych na etapach produkcji i przechowywania zanieczyszczeń, a przez to zwiększenie czułości rozdziału. Tak oczyszczone i wysuszone płytki poddawano następnie impregnacji. W przypadku profenów zanurzano je na około 2 sekundy w metanolowym roztworze *L*-argininy o stężeniu $3 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Dla kwasu migdałowego jako impregnatu użyto wodnego roztworu octanu miedzi(II) o stężeniu $5,01 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. W przypadku α -fenyloglicyny oczyszczone płytki najpierw zanurzano na 2 sekundy w wodnym roztworze siarczanu(VI) miedzi(II) o stężeniu $5,01 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$, następnie wygrzewano je przez 10 minut w suszarce w temperaturze 110°C, a po ostygnięciu jeszcze raz zanurzano je na 2 sekundy, tym razem w metanolowo-wodnym (9:1, v/v) roztworze *L*-proliny o stężeniu $3,04 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Impregnacji nie zastosowano tylko w przypadku części płytek, na których rozwijano etanolowo-wodny roztwór *R,S*-(\pm)-ketoprofenu.

Rozwijanie chromatogramów w wariancie jednokierunkowym było stosowane dla α -fenyloglicyny, kwasu migdałowego i ketoprofenu, natomiast wariantu dwukierunkowego użyto w przypadku flurbiprofenu, kwasu migdałowego i ketoprofenu.

W wariancie jednokierunkowego rozwijania chromatogramów badane anality (o określonej objętości roztworów) наносzono na płytki chromatograficzne ręcznie (przy pomocy mikrokapilar), lub przy pomocy automatycznego aplikatora. Następnie chromatogramy rozwijano w komorze wg Stahla (po uprzednim nasyceniu jej przez okres 30 minut parami fazy ruchomej). W przypadku profenów długość drogi migracji fazy ruchomej wynosiła 150 mm, natomiast dla α -fenyloglicyny i kwasu migdałowego ta długość wynosiła 85 mm. Po rozwinięciu chromatogramy suszono, a następnie densytometrowano. W trakcie analizy mierzono czas rozwijania chromatogramu i temperaturę otoczenia. Badane anality przechowywano w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ najwyżej przez okres 26 dni i chromatografowano je jeden raz dziennie przez okres do jednego miesiąca (z wyłączeniem dni wolnych od pracy), a tylko *R,S*-(\pm)-ketoprofen był przechowywany przez jeden rok i chromatografowany po tym okresie. Każdy eksperyment był powtarzany co najmniej trzykrotnie.

W wariancie dwukierunkowego rozwijania chromatogramów badany analit наносzono na płytki chromatograficzne ręcznie (przy pomocy mikrokapilar), lub przy pomocy automatycznego aplikatora w postaci pojedynczej plamki w jednym z narożników płytki chromatograficznej. Następnie chromatogram rozwijano w wariancie jednokierunkowym w komorze wg Stahla (po uprzednim nasyceniu jej przez okres 30 minut parami fazy ruchomej). W przypadku profenów długość drogi migracji fazy ruchomej wynosiła 150 mm, natomiast dla kwasu migdałowego ta długość wynosiła 85 mm. Po rozwinięciu chromatogram suszono, a następnie densytometrowano, po czym rozwijano chromatogram w drugim kierunku, prostopadłym do rozwijania jednokierunkowego, w komorze wg Stahla, w tej samej fazie ruchomej, stosując tę samą długość drogi migracji fazy ruchomej. Analogicznie po rozwinięciu chromatogram suszono, a następnie skanowano densytometrycznie na szerokości 30 mm w odstępach 1 mm między poszczególnymi skanami. Każdy eksperyment był powtarzany co najmniej pięciokrotnie.

Skanowanie densytometryczne prowadzono przy użyciu lampy deuterowej o wymiarze prostokątnej wiązki światła wynoszącym $2,0\text{ mm} \times 0,1\text{ mm}$.

Tabela 6. Układy chromatograficzne TLC stosowane dla poszczególnych analitów

Analit	Rozpuszczalnik analitu	Faza stacjonarna	Skład fazy ruchomej (v/v)	Stężenie molowe analitu [mol dm ⁻³]	Objętość nanoszonej próbki [μl]	Długość fali stosowana podczas densymetrowania [nm]
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
S-(+)-Flurbiprofen R-(-)-Flurbiprofen	etanol-woda (7:3, v/v)	żel krzemionkowy impregnowany L-argininą	etanol z 0,5% zawartością lodowatego kwasu octowego	0,41 × 10 ⁻³	3	245
				2,05 × 10 ⁻³		
				4,10 × 10 ⁻³		
				1,64 × 10 ⁻³		
R,S-(±)-Flurbiprofen L-(+)-α-Fenylloglicyna D-(-)-α-Fenylloglicyna D,L-(±)-α-Fenylloglicyna Skalematy α-fenylloglicyny	etanol-woda (7:3, v/v)	żel krzemionkowy impregnowany solą miedzi(II) i L-proliną	n-butaol-acetonitryl-woda (6:2:3)	3,33 × 10 ⁻³	20	200
D,L-(±)-α-Fenylloglicyna	etanol-woda (1:9, v/v)					
	etanol-woda (2:8, v/v)					
	etanol-woda (3:7, v/v)					
	etanol-woda (4:6, v/v)					
	etanol-woda (5:5, v/v)					
	etanol-woda (6:4, v/v)					
	etanol-woda (19:1, v/v)					
	etanol absolutny					

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Kwas <i>S</i> -(+)-migdałowy Kwas <i>R</i> -(-)-migdałowy Kwas <i>R,S</i> -(±)-migdałowy	etanol-woda (7:3, v/v)	żel krzemionkowy impregnowany solą miedzi(II)	dioksan-woda (9:1)	2,79 × 10 ⁻¹ (rozwijanie jednokierunkowe) 5,59 × 10 ⁻¹ (rozwijanie dwukierunkowe)	1,5 (rozwijanie jednokierunkowe) 3 (rozwijanie dwukierunkowe)	305
	etanol-woda (7:3, v/v)	żel krzemionkowy impregnowany <i>L</i> -argininą	acetonitrylu-woda (5:1) z 0,5% zawartością lódowego kwasu octowego	3,0 × 10 ⁻⁴	5	252
<i>S</i> -(+)-Ketoprofen	etanol-lódowaty kwas octowy (7:3, v/v)					
<i>R,S</i> -(±)-Ketoprofen	etanol-bufor o pH=9 (7:3, v/v)	żel krzemionkowy impregnowany <i>L</i> -argininą				
	etanol-woda (7:3, v/v)	żel krzemionkowy impregnowany <i>L</i> -argininą				

7.3.2. Technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją na matrycy fotodiodowej (HPLC-DAD)

W ramach przeprowadzonych badań zastosowano technikę HPLC z detekcją DAD do analizy roztworów *S*-(+)-ketoprofenu, *L*-(+)- α -fenyloglicyny, *D*-(-)- α -fenyloglicyny, kwasu *S*-(+)-migdałowego, kwasu *R*-(-)-migdałowego, oraz racematów α -fenyloglicyny i kwasu migdałowego (przygotowano je przez zmieszanie równomolowych ilości poszczególnych enancjomerów). W tym celu wykorzystano chromatografy cieczowe firm Gyncoetek i Varian, opisane w Rozdz. 7.2. Tabela 7 przedstawia charakterystykę badanych układów i warunków chromatografowania.

Tabela 7. Układy chromatograficzne HPLC stosowane dla poszczególnych analitów.

Analit	Rozpuszczalnik analiu	Faza stacjonarna	Skład fazy ruchomej (v/v)	Stężenie molowe analitu [mol dm ⁻³]	Prędkość przepływu fazy ruchomej [ml min ⁻¹]	Temperatura pracy kolumny [°C] ([K])	Objętość próbki [μl]
<i>S</i> -(+)-Ketoprofen	acetonitryl	RP-18	metanol-woda (5:5)	$3,93 \times 10^{-3}$	0,6	35 (308)	20
<i>L</i> -(+)- α -Fenyloglicyna <i>D</i> -(-)- α -Fenyloglicyna <i>D,L</i> (±)- α -Fenyloglicyna	etanol-woda (7:3, v/v)	RP-18	metanol-woda (6:4)	$3,33 \times 10^{-3}$	0,6	35 (308)	20
Kwas <i>S</i> -(+)-migdałowy Kwas <i>R</i> -(-)-migdałowy Kwas <i>R,S</i> (±)-migdałowy	etanol-woda (7:3, v/v)	RP-18	metanol-woda (5:5)	$5,59 \times 10^{-3}$	0,5	35 (308)	40

Roztwór *S*-(+)-ketoprofenu w acetonitrylu był chromatografowany przez okres 30 godzin w odstępach 25-minutowych oraz po 8 dniach od chwili jego sporządzenia. Etanolowo-wodne roztwory α -fenyloglicyny i kwasu migdałowego były poddawane analizie chromatograficznej dwa razy dziennie przez okres 9 dni oraz po wpływie jednego roku od momentu ich sporządzenia.

7.3.3. Technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (HPLC-MS)

Techniki HPLC sprzężonej z spektrometrem MS użyto do badań roztworów *S*-(+)-ketoprofenu, *L*-(+)- α -fenyloglicyny, *D*-(-)- α -fenyloglicyny, kwasu *S*-(+)-migdałowego, kwasu *R*-(-)-migdałowego, oraz racematów α -fenyloglicyny i kwasu migdałowego.

Do analizy roztworu *S*-(+)-ketoprofenu w acetonitrylu o stężeniu $3,93 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ zastosowano system LC-MS składający się z chromatografu cieczowego i spektrometru masowego firmy Varian, opisanych w Rozdz. 7.2. Roztwór ten był chromatografowany przez okres 50 godzin w odstępach 50-minutowych. Faza stacjonarna była typu RP-18, natomiast faza ruchoma składała się z metanolu i wody (5:5, v/v), a jej przepływ był równy $0,2 \text{ ml min}^{-1}$. Objętość wprowadzanej na kolumnę próbki wynosiła 5 μl . Temperatura pracy kolumny wynosiła 22°C (295 K). Detekcja w spektrometrze masowym z systemem ESI była prowadzona w następujących warunkach:

- jonizacja pozytywna,
- temperatura komory rozpylania 45°C ,
- temperatura gazu 150°C ,
- ciśnienie gazu 25 psi,
- napięcie na kapilarze 70 V,
- napięcie na igle 5 kV.

W przypadku etanolowo-wodnych (7:3, v/v) roztworów antymerów i racematów α -fenyloglicyny i kwasu migdałowego widma masowe były rejestrowane dla całkowitego składu próbki, bez jej wstępnego rozdzielania chromatograficznego. Rejestrowanie widm odbywało się dla świeżo przygotowanych roztworów i dla tych przechowywanych przez okres jednego roku. Stężenie roztworów α -fenyloglicyny wynosiło $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, a roztworów kwasu migdałowego $5,59 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Warunki pracy spektrometru masowego dla α -fenyloglicyny były takie same, jak dla *S*-(+)-ketoprofenu, natomiast dla kwasu migdałowego były następujące:

- jonizacja pozytywna,
- temperatura komory rozpylania 45°C ,
- temperatura gazu 150°C ,
- ciśnienie gazu 15 psi,
- napięcie na kapilarze 80 V,
- napięcie na igle 5 kV.

7.3.4. Technika spektroskopii ^{13}C NMR

Do przeprowadzenia badań techniką spektroskopii ^{13}C NMR dla *S*-(+)-ketoprofenu i kwasu *S*-(+)-migdałowego zastosowano spektrometr NMR opisany w Rozdz. 7.2. Do rejestracji widm użyto świeżo sporządzonego i przechowywanego przez okres jednego roku etanolowo-wodnego (7:3, v/v) roztworu *S*-(+)-ketoprofenu o stężeniu $3,93 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Z obu tych roztworów odparowano rozpuszczalnik, a następnie suchą pozostałość rozpuszczono w deuterowanym chloroformie (CDCl_3). W przypadku kwasu *S*-(+)-migdałowego z próbki przechowywanej przez okres 10 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ odparowano etanol, zastępując go deuterowanym chloroformem (CDCl_3), a następnie zarejestrowano widmo ^{13}C NMR. Aby otrzymać widmo o odpowiednim stosunku sygnału do szumu wykonano 7000 skanów z opóźnieniem (D1) wynoszącym 8 sekund.

7.3.5. Pomiary polarymetryczne

Zastosowanie polarymetrii pozwoliło uzyskać informacje na temat zmian skręcalności właściwej roztworów badanych analitów, tj. *S*-(+)-flurbiprofenu, *R*-(-)-flurbiprofenu, *L*-(+)- α -fenyloglicyny, *D*-(-)- α -fenyloglicyny, kwasu *S*-(+)-migdałowego, kwasu *R*-(-)-migdałowego, *S*-(+)-ketoprofenu i *R,S*-(\pm)-ketoprofenu, w czasie ich przechowywania. Pomiary prowadzono w sposób nieciągły z zastosowaniem polarymetru firmy Carl-Zeiss i w sposób ciągły przy użyciu polarymetru firmy Perkin-Elmer (oba zostały opisane w Rozdz. 7.2). W obu przypadkach długość fali wynosiła 589 nm, co odpowiada linii D sodu. Długości użytych celek polarymetrycznych wynosiły 1 dm, a objętości badanych roztworów 1 ml. Skręcalność właściwą $[\alpha]_D$ badanych próbek obliczono ze wzoru:

$$[\alpha]_D = \frac{100\alpha}{cd}$$

gdzie: α oznacza zmierzony kąt skręcenia, c to stężenie próbki w gramach przypadające na 100 ml roztworu, a d to długość drogi optycznej.

Krok czasowy przy rejestracji nieciągłej wynosił 15 minut, a jedynie dla flurbiprofenu był równy 10 minut. Krok czasowy dla rejestracji ciągłej wynosił 30 milisekund.

Tabela 8 przedstawia charakterystykę stosowanych układów i warunków prowadzenia eksperymentów z zastosowaniem polarymetrii.

Tabela 8. Stosowane układy i warunki prowadzenia eksperymentów z zastosowaniem polarymetrii.

Analit	Rozpuszczalnik analitu	Stężenie molowe analitu [mol dm ⁻³]	Temperatura badanego roztworu [°C]	Użycie ultradźwięków do mieszania roztworów	Okres prowadzenia pomiarów w systemie nieciągłym	Okres prowadzenia pomiarów w systemie nieciągłym
S-(+)-Flurbiprofen	etanol-woda (7:3, v/v)	2,05 × 10 ⁻³	22±1	Nie	8 dni	brak
			22±1	Nie	9 dni	9 h
R-(-)-Flurbiprofen	etanol-woda (7:3, v/v)	2,05 × 10 ⁻³	22±1	Nie	6 h	brak
			22±1	Tak		
			9±1	Nie		
L-(+)-α-Fenyloglicyna	etanol-woda (7:3, v/v)	3,33 × 10 ⁻³	22±1	Nie	4 dni	5 h
			22±1	Nie	8 dni	
D-(-)-α-Fenyloglicyna	etanol-woda (7:3, v/v)	5,59 × 10 ⁻³	22±1	Nie	34 dni	24 h
			22±1		6 h	brak
			9±1			
Kwas S-(+)-migdłowy	etanol-woda (7:3, v/v)	5,59 × 10 ⁻³	22±1	Nie	26 dni	2 h
			22±1		6 h	brak
			9±1			
Kwas R-(-)-migdłowy	etanol-woda (7:3, v/v)	3,0 × 10 ⁻²	22±1	Nie	10 dni	4,5 h
			22±1	Nie	6 h	brak
			9±1	Nie		
S-(+)-Ketoprofen	etanol-woda (7:3, v/v)	3,0 × 10 ⁻²	22±1	Nie	6 h	brak
			22±1	Tak		
	etanol-woda (7:3, v/v)	3,0 × 10 ⁻²	9±1	Nie		
			9±1	Tak		
	etanol-lodowaty kwas octowy (7:3, v/v)	3,0 × 10 ⁻²	22±1	Nie		
			22±1	Tak		
	etanol-bufor o pH=9 (7:3, v/v)	3,0 × 10 ⁻²	9±1	Nie		
			9±1	Tak		
	etanol-woda (7:3, v/v)	1,5 × 10 ⁻¹	22±1	Nie		
			22±1	Nie	4 h	brak

7.3.6. Pomiary mikroskopowe

Obserwacje dwóch warstw powstałych w etanolowo-wodnym (7:3, v/v) roztworze *R,S*-(±)-ketoprofenu o stężeniu $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, przechowywanym przez okres jednego roku, były prowadzone pod mikroskopem polaryzacyjnym, opisanym w Rozdz. 7.2, bez użycia polaryzacji. Kilka mikrolitrów badanych warstw zostało umieszczonych między szkiełkami mikroskopowymi w taki sposób, że ich warstwa wynosiła około 0,16 mm. Stosowano powiększenia 100x i 500x. Podczas prowadzonych obserwacji zastosowano filtr wodny w celu wyeliminowania promieniowania podczerwonego oraz zapobieżenia ogrzewaniu próbki, którego źródłem mogła być lampa mikroskopowa. Filtrem tym był przezroczysty, plastikowy, okrągły pojemnik z warstwą wody o grubości 0,5 cm. Zdjęcia obserwowanego roztworu wykonano cyfrowym aparatem fotograficznym, opisanym w Rozdz. 7.2.

7.3.7. Reakcja biuretowa

Przeprowadzenie reakcji biuretowej umożliwia wykrycie obecności związków posiadających wiązanie peptydowe w roztworach. Jest to możliwe, gdyż w przypadku obecności peptydów, w środowisku zasadowym, jon Cu^{2+} jest kompleksowany przez najmniej dwie grupy peptydowe (w przypadku dipeptydów), dzięki czemu roztwór zmienia kolor z niebieskiego, odpowiadającego solwatowanym jonom miedzi, do różowego charakterystycznego dla dipeptydów, bądź fioletowego dla wyższych peptydów. Intensywność koloru jest proporcjonalna do ilości wiązań peptydowych. Nazwa wywodzi się od biuretu, czyli dimocznika $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$, który posiada wiązanie analogiczne do peptydowego, które może koordynować jon miedzi.

Odczynnik biuretowy zawierał 7,5 g $\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ oraz 100 ml 50% NaOH, rozcieńczonych wodą do objętości 1 dm^3 [225]. Do objętości 5 ml roztworów czystego enancjomerów i racematu α -fenyloglicyny, dodano 5 ml wyżej wymienionego odczynnika.

7.3.8. Test mikrobiologiczny

Testom mikrobiologicznym poddano etanolowo-wodne (7:3, v/v) roztwory *L*-(+)- α -fenyloglicyny i *D*-(-)- α -fenyloglicyny o stężeniach równych $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, przechowywanych wcześniej przez okres jednego roku w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Testy te wykonano dwiema metodami.

Pierwsza metoda polegała na wprowadzeniu roztworów obu antymerów α -fenyloglicyny do pożywki stałej i do pożywki ciekłej. Pożywka stała o pH=7,4 zawierała:

- ekstrakt mięsa o stężeniu $2,0 \text{ g dm}^{-3}$,
- ekstrakt drożdży o stężeniu $2,0 \text{ g dm}^{-3}$,
- roztwór peptonu o stężeniu $5,0 \text{ g dm}^{-3}$,
- roztwór chlorku sodu o stężeniu $4,0 \text{ g dm}^{-3}$,
- roztwór agaru o stężeniu $15,0 \text{ g dm}^{-3}$.

Natomiast pożywka ciekła zawierała:

- ekstrakt mięsa o stężeniu $0,4 \text{ g dm}^{-3}$,
- roztwór hydrolizatu drożdży o stężeniu $1,7 \text{ g dm}^{-3}$,
- roztwór enzymatycznego hydrolizatu kazeiny o stężeniu $5,4 \text{ g dm}^{-3}$,
- roztwór peptonu o stężeniu $4,0 \text{ g dm}^{-3}$,
- roztwór chlorku sodu o stężeniu $3,5 \text{ g dm}^{-3}$.

Pierwszą serię próbek (pożywka stała plus dodatek 100 μl roztworu danego antymeru) poddano 7-dniowej inkubacji w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$, a drugą z nich (50 ml pożywki ciekłej zmieszanej z 100 μl roztworu danego antymeru) poddano 14-dniowej inkubacji z ciągłym mieszaniem z szybkością 260 obrotów mieszadła na minutę, również w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Obserwacje badanych preparatów prowadzono pod mikroskopem.

Jako drugą zastosowano metodę Bradforda [226] na oznaczanie zawartości białka, a konkretnie DNA, w próbkach. Roztwory antymerów α -fenyloglicyny zmieszano z odczynnikiem Bradforda i spektrofotometrycznie mierzono ich absorbancję przy długości fali świetlnej 260 nm. Metoda Bradforda wykorzystuje zdolność wiązania barwnika błękitu brylantowego Coomassie G-250 (ang. Coomassie Brilliant Blue) z białkiem. Po związaniu z białkiem maksimum absorpcji dla barwnika przesuwają się w stronę fal dłuższych.

7.4. Wyniki badań i ich omówienie

7.4.1. Zjawisko oscylacyjnej inwersji chiralnej oraz oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) *S*-(+)-flurbiprofenu i *R*-(-)-flurbiprofenu

7.4.1.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa

Celem niniejszych badań było eksperymentalne stwierdzenie, czy enancjomery flurbiprofenu ulegają inwersji chiralnej, to znaczy przemianie antymeru *S*-(+) w *R*-(-) i odwrotnie, jak to przedstawiono poniższym równaniem:



Równanie to może zostać poszerzone o szczegóły prezentowane na Rys. 7, gdy weźmiemy pod uwagę inwersję chiralną wybranego kwasu karboksylowego zachodzącą w wodnym roztworze lub na Rys. 8, gdy proces ten zachodzi w roztworze niewodnym.

Jak do tej pory, nie istnieją żadne doniesienia literaturowe na temat rozdziału enancjomerów flurbiprofenu metodą chromatografii cienkowarstwowej. Warunki rozdziału dla układu TLC były wzorowane na danych zawartych w publikacji Bhushana i Parshada [222], którzy jako pierwsi opracowali warunki rozdziału chromatograficznego dla antymerów ibuprofenu. Jako fazę stacjonarną wykorzystano gotowe płytki chromatograficzne pokryte żelem krzemionkowym i zaimpregnowane metanolem z roztworem *L*-argininy. Na fazę ruchomą składał się czysty etanol z 0,5% zawartością lodowatego kwasu octowego. Kwasu octowego użyto do sprotonowania grupy aminowej *L*-argininy i dzięki temu rozdział enancjomerów był oparty na mechanizmie tworzenia par jonowych, według następujących równań:

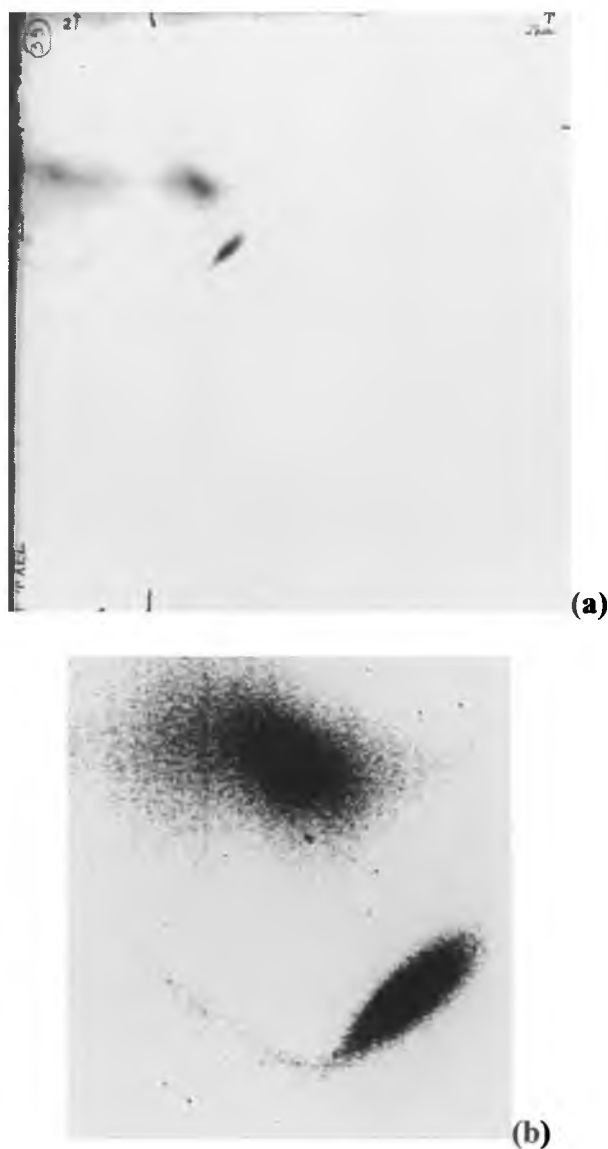


gdzie K_1 i K_2 przedstawiają stałe równowagi reakcji, natomiast nierówność $K_1 \neq K_2$ jest warunkiem rozdziału chromatograficznego dwu antymerów flurbiprofenu.

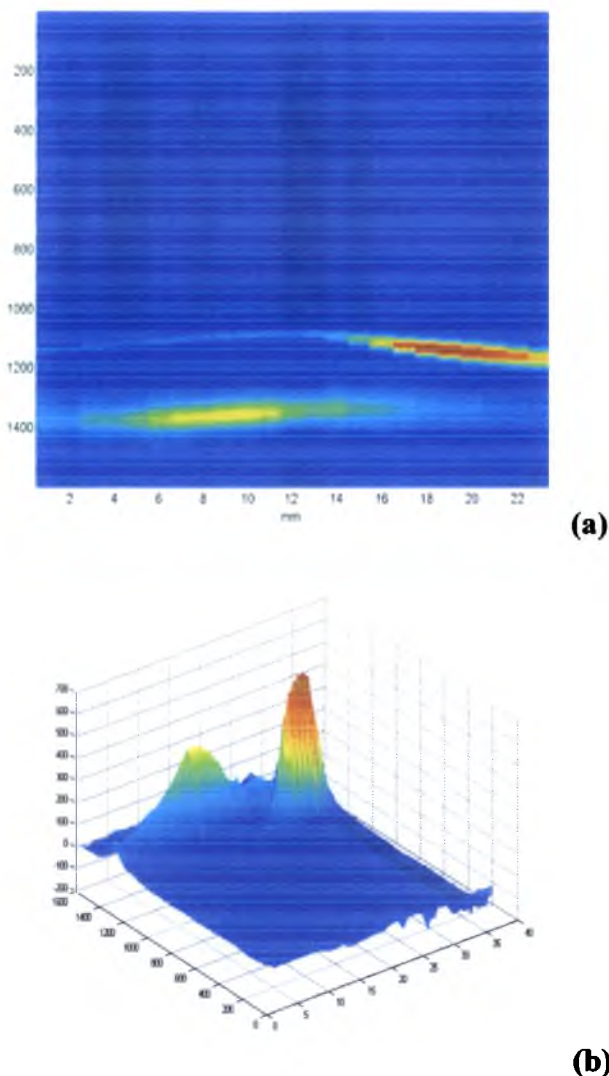
We wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach użyto świeżo sporządzone roztwory *S*-(+)-flurbiprofenu oraz *R*-(-)-flurbiprofenu w mieszaninie etanolu i wody w stosunku

objętościowym 7:3, o trzech różnych stężeniach równych 0,1, 0,5 i 1,0 mg cm⁻³. Przygotowano również roztwór testowy, tj. mieszaninę racemiczną *R,S*-(±)-flurbiprofenu o stężeniu 0,2 mg cm⁻³ dla każdego z enancjomerów, przy zastosowaniu tego samego rozpuszczalnika.

W celu sprawdzenia, czy warunki odpowiednie do rozdziału enancjomerów ibuprofenu pozwalają również na rozdział enancjomerów flurbiprofenu, testowy roztwór mieszaniny racemicznej badanego związku poddano procesowi chromatografowania w wyżej wymienionych warunkach. Zastosowano dwukierunkowe rozwijanie płytek chromatograficznych. Wyniki tego procesu przedstawiają Rys. 36 i 37.



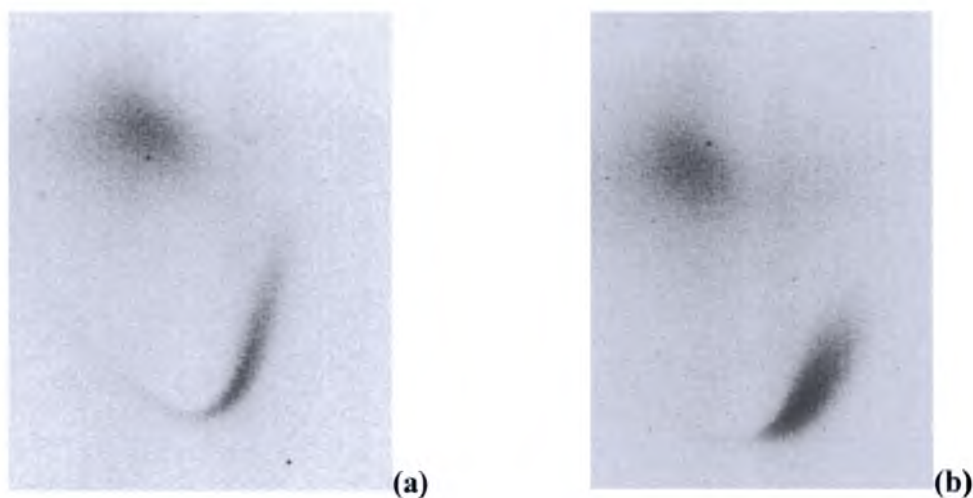
Rys. 36. Wideoskany (a) całej płytki chromatograficznej rozwijanej w dwóch kierunkach oraz (b) powiększonego obszaru, na którym nastąpił rozdział antymerów flurbiprofenu [227].



Rys. 37. (a) Dwuwymiarowy i **(b)** trójwymiarowy densytogram przedstawiający rozdział enancjomerów flurbiprofenu. Obrazy te wygenerowano przez densytometryczne skanowanie chromatogramu 30 liniami w odstępach 1 mm [227].

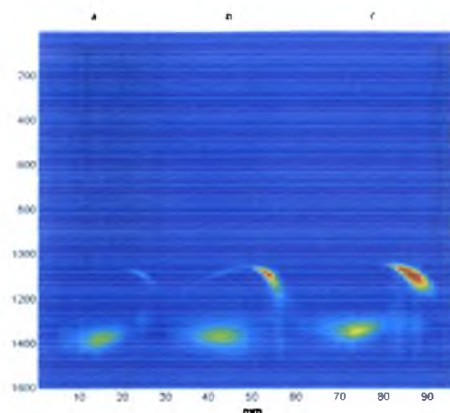
Dwie plamki widoczne na Rys. 36 zostały poddane analizie. Pierwszym sposobem identyfikacji plamek była densytometryczna rejestracja widm UV każdej z nich bezpośrednio z chromatografowanej płytki. Obie plamki dały identyczne widmo w ultrafiolecie. Co więcej, z płytki zdrapano żel krzemionkowy z umiejscowionymi plamkami, a każdą próbkę żelu z osobna zalano etanolem. Następnie tak przygotowane roztwory przesączono, zagęszczono i poddano analizie techniką niechiralnej HPLC–DAD. Otrzymane wyniki dla każdej z próbek były takie same. Maksima pików chromatograficznych odpowiadających każdej z dwóch plamek posiadały jednakowe czasy retencji i jednakowe widma UV. Można zatem stwierdzić, iż doszło do rozdziału mieszaniny racemicznej flurbiprofenu, a każda z plamek reprezentuje jeden z enancjomerów.

Następnym etapem eksperymentu była próba określenia każdej z plamek, jako odpowiednio *S*-(+)- oraz *R*-(-)-flurbiprofenu. W tym celu chromatografowano świeżo sporządzone etanolowo-wodne roztwory każdego z nich w takich samych warunkach, co testowy roztwór mieszaniny racemicznej. Niestety, nie udało się zidentyfikować plamek, gdyż chromatogramy otrzymane dla każdego z antymerów flurbiprofenu wyglądały identycznie, jak chromatogram otrzymany dla roztworu testowego, co widać na Rys. 38a i b, które są praktycznie takie same, jak Rys. 36b.

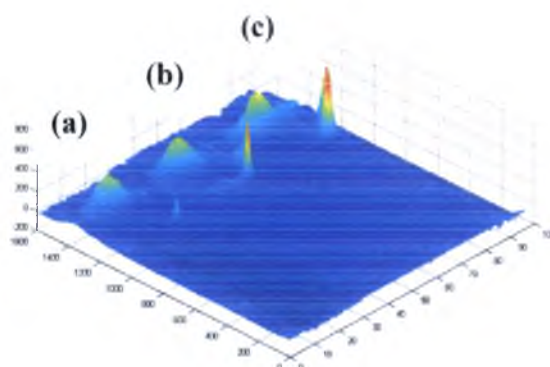


Rys. 38. Wideoskany chromatogramów uzyskanych dla (a) *S*-(+)-flurbiprofenu i (b) *R*-(-)-flurbiprofenu.

Ostatnim etapem eksperymentu było wykazanie ilościowej zależności rozdzielanych antymerów od początkowego stężenia próbki. W tym celu dla każdego z enancjomerów flurbiprofenu sporządzono roztwory etanolowo-wodne o trzech różnych stężeniach, o czym wspomniano już wcześniej, a następnie chromatografowano je w identyczny sposób, jak poprzednio. Na Rys. 39 i 40 przedstawiono wyniki otrzymane jedynie dla *R*-(-)-flurbiprofenu, ponieważ jego antymer *S*-(+) zachowuje się w podanych warunkach dokładnie tak samo. Jak widać, Rys. 39a-c są analogiczne z Rys. 37a, natomiast Rys. 40a-c z Rys. 37b. Wynika z nich jednoznacznie, że w miarę wzrostu początkowego stężenia czystego, pojedynczego enancjomeru, profile stężeniowe i rozdzielone pasma obu składników zracemizowanego związku również wzrastają.



Rys. 39. Dwuwymiarowy densytogram przedstawiający zależność wysokości profili stężeniowych rozdzielanych antymerów od początkowego stężenia *R*-(-)-flurbiprofenu równego (a) $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$, (b) $0,5 \text{ mg cm}^{-3}$ i (c) $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$. Densytogram wygenerowany na podstawie wyników otrzymanych przez skanowanie odpowiednich chromatogramów 30 liniami w odstępach 1 mm.

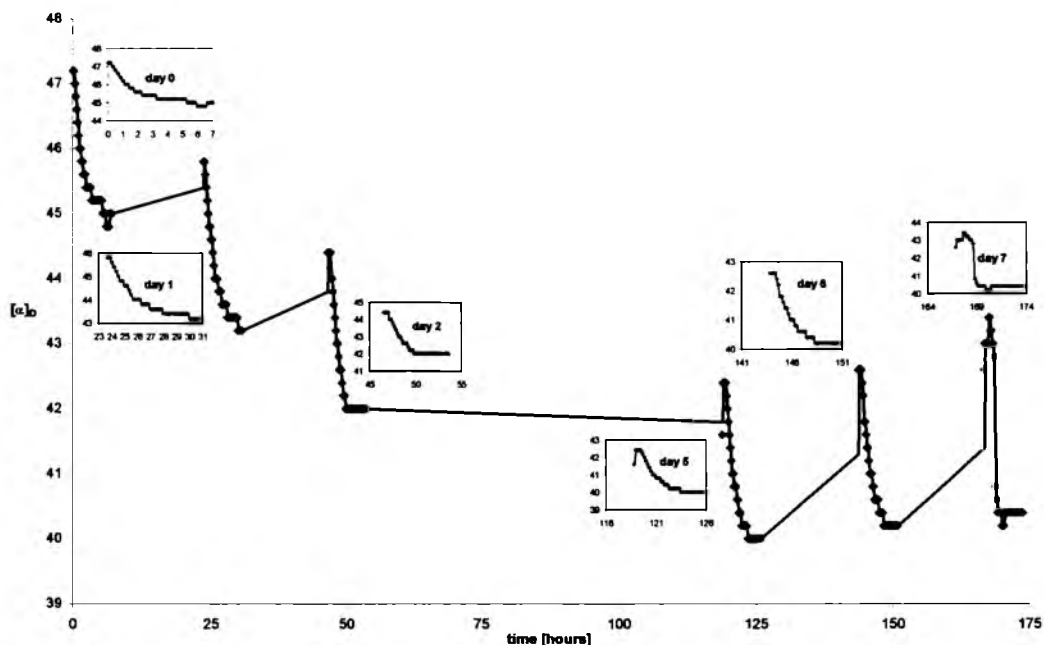


Rys. 40. Trójwymiarowy densytogram przedstawiający zależność wysokości profili stężeniowych rozdzielanych antymerów od początkowego stężenia *R*-(-)-flurbiprofenu równego (a) $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$, (b) $0,5 \text{ mg cm}^{-3}$ i (c) $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$. Densytogram wygenerowany na podstawie wyników otrzymanych przez skanowanie odpowiednich chromatogramów 30 liniami w odstępach 1 mm [227].

Wobec uzyskanych techniką chromatografii cienkowarstwowej wyników nasuwa się pytanie o naturę chemiczną plamek, skoro w badanych przypadkach rozwijano roztwory pojedynczych czystych enancjomerów flurbiprofenu. Jedynym rozsądnym wytłumaczeniem wydaje się być fakt, iż każdy z dwóch enancjomerów ulegał bardzo szybkiej racemizacji, być może wywołanej przez sam proces chromatografowania. Jest to cenna informacja na temat łatwości, z jaką rozpatrywany profen ulega samorzutnej racemizacji, jeśli znajduje się w odpowiednim środowisku. Jednocześnie wyklucza to możliwość stosowania opracowanego układu TLC jako narzędzia identyfikacji i ilościowego oznaczania poszczególnych enancjomerów flurbiprofenu w konkretnych zadaniach analitycznych.

7.4.1.2. Polarymetria

Badanie zmian skręcalności właściwej *S*-(+)-flurbiprofenu było przeprowadzone w roztworze etanolowo-wodnym w stosunku objętościowym obydwu rozpuszczalników równym 7:3, przechowywanym przez 8 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Rejestracja w sposób nieciągły była prowadzona prawie codziennie, po kilka godzin dziennie w 10-minutowych odstępach czasu. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rys. 41.



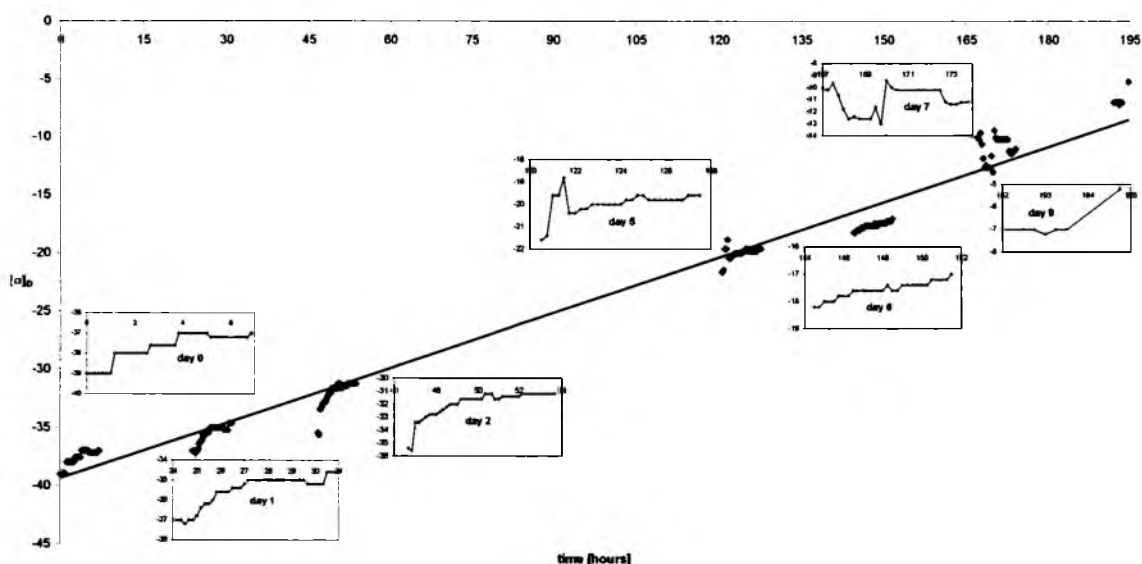
Rys. 41. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla *S*-(+)-flurbiprofenu rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Główny kierunek zmian jest zaznaczony linią ciągłą, a wykresy w „okienkach” obrazują zmiany zachodzące w wybranych dniach przeprowadzanego eksperymentu [227.228].

Rys. 41 pokazuje, iż zmiany skręcalności właściwej w przypadku *S*-(+)-flurbiprofenu są z natury oscylacyjne, co jest szczególnie dobrze widoczne w „okienkach” zamieszczonych na tym rysunku oraz, że długoterminowy trend zmian wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ wskazuje na postępujący proces racemizacji *S*-(+)-flurbiprofenu, gdyż wartości liczbowe $[\alpha]_D$ zmierzają do zera.

Wyniki badań polarymetrycznych oraz badań przeprowadzonych techniką chiralnej chromatografii cienkowarstwowej wyraźnie wskazują na to, iż *S*-(+)-flurbiprofen łatwo może ulegać oscylacyjnej inwersji chiralnej, po uprzednim rozpuszczeniu w zawierającym wodę rozpuszczalniku niskocząsteczkowym.

Badania zmian skręcalności właściwej *R*-(-)-flurbiprofenu były przeprowadzone w trzech seriach doświadczeń.

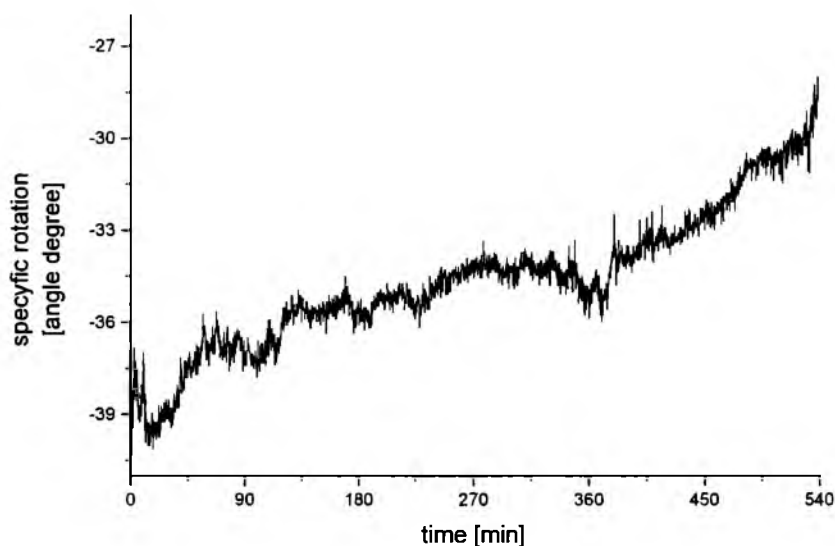
W pierwszym doświadczeniu zmiany skręcalności właściwej *R*-(-)-flurbiprofenu w roztworze etanolowo-wodnym, przechowywanym przez 9 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$, były rejestrowane w sposób nieciągły prawie codziennie, po kilka godzin dziennie w 10-minutowych odstępach czasu. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rys. 42.



Rys. 42. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla *R*-(-)-flurbiprofenu rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Główny kierunek zmian jest zaznaczony linią ciągłą, a wykresy w „okienkach” obrazują zmiany zachodzące w wybranych dniach przeprowadzanego eksperymentu [227,228].

Rys. 42 pokazuje, iż zmiany skręcalności właściwej *R*-(-)-flurbiprofenu są z natury oscylacyjne, co jest najlepiej widoczne w „okienkach” zamieszczonych na tym rysunku, a długoterminowy trend zmian wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ wskazuje na postępujący proces racemizacji *R*-(-)-flurbiprofenu (wartości $[\alpha]_D$ zmierzają do zera).

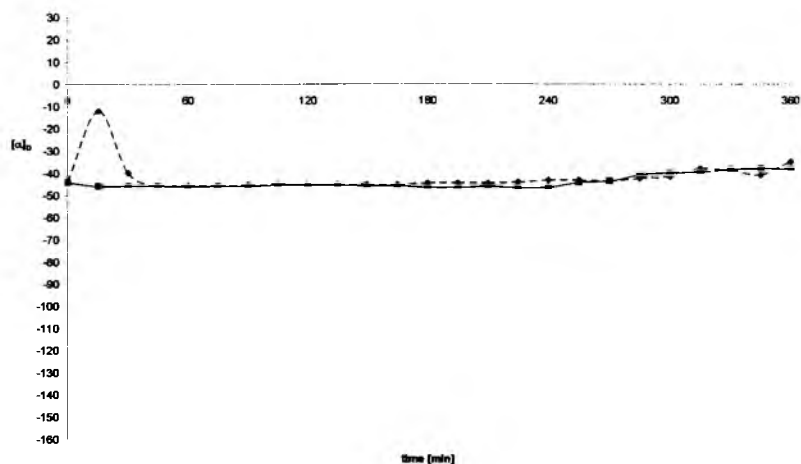
W drugim eksperymencie polarymetrycznym rejestrację oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej przeprowadzono w sposób ciągły, również w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ przez pierwszych 9 godzin od chwili sporządzenia roztworu *R*-(-)-flurbiprofenu w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym. Uzyskany wynik przedstawiono na Rys. 43.



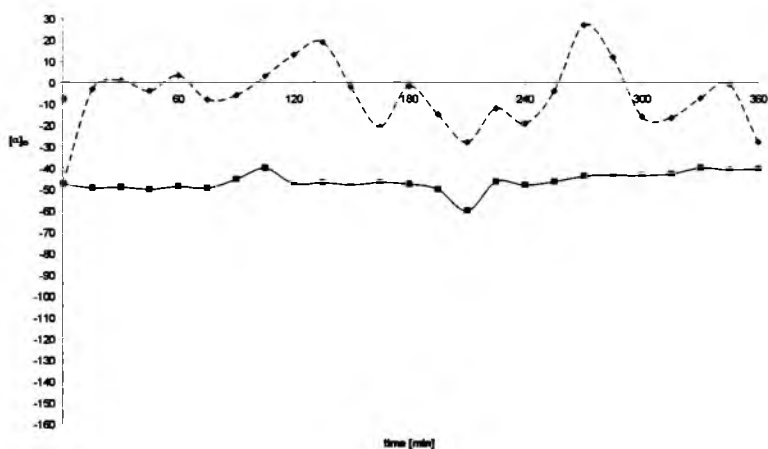
Rys. 43. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla *R*-(-)-flurbiprofenu rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ [228].

Wynik ciągłej rejestracji zmian skręcalności właściwej roztworu *R*-(-)-flurbiprofenu w funkcji czasu stanowi kolejny dowód na to, iż obserwowane zmiany mają charakter oscylacyjny.

W trzeciej serii doświadczeń skręcalność właściwa $[\alpha]_D$ roztworów *R*-(-)-flurbiprofenu była mierzona w sposób nieciągły przez okres 6 godzin w dwóch temperaturach: $9 \pm 1^\circ\text{C}$ i $22 \pm 1^\circ\text{C}$. W każdej temperaturze przeprowadzano dwa równoległe pomiary: jeden dla roztworu poddawanego działaniu ultradźwięków, a drugi dla roztworu nie poddawanego temu działaniu. W żadnym z tych dwóch przypadków skręcalność właściwa nie pozostawała niezmienna w czasie. Przeciwnie, obserwowano oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej w trakcie całego czasu trwania eksperymentu. Amplituda tych zmian była jednakże znacznie mniejsza w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$, niż w temperaturze $9 \pm 1^\circ\text{C}$. Na Rys. 44a i b przedstawiono wyniki uzyskane w trzeciej serii doświadczeń.



(a)



(b)

Rys. 43. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla *R*-(-)-flurbiprofenu rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3 przechowywanego w temperaturze (a) $22 \pm 1^\circ\text{C}$ i (b) $9 \pm 1^\circ\text{C}$. Wyniki dla roztworów poddawanych działaniu ultradźwięków i nie poddawanych temu działaniu przedstawiono odpowiednio linią przerywaną i linią ciągłą.

Rejestracja zmian skręcalności właściwej w trzeciej serii prowadzonego eksperymentu polarymetrycznego miała na celu wyeksponowanie wpływu czynnika dyfuzyjnego na przebieg obserwowanego procesu, najprawdopodobniej będącego samorzutną oscylacyjną inwersją chiralną *R*-(-)-flurbiprofenu. Wpływ czynnika dyfuzyjnego starano się wyeksponować poprzez obniżenie temperatury badanego roztworu, co wiąże się ze wzrostem jego lepkości oraz przez porównanie przebiegu oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej roztworu mieszanego przy pomocy ultradźwięków oraz roztworu niemieszanego. Silny wzrost amplitudy oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ badanych roztworów, wywołany obniżeniem ich temperatury i jednoczesnym wzrostem ich lepkości wskazuje na

bardzo istotną rolę dyfuzji w badanym procesie, jak to ma bardzo często miejsce w przypadku różnych reakcji oscylacyjnych.

Zastosowanie ultradźwięków do mieszania badanych roztworów miało na celu ułatwienie dyfuzji cząsteczek flurbiprofenu w tych roztworach, a przez to obniżenie wpływu czynnika dyfuzyjnego na proces inwersji chiralnej i być może częściowe stłumienie, albo nawet wyeliminowanie zjawiska oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej. Tymczasem kształt krzywych pozwala wnioskować, że mieszanie badanych próbek ultradźwiękami nie wpływa znacząco na amplitudę skręcalności właściwej badanych roztworów.

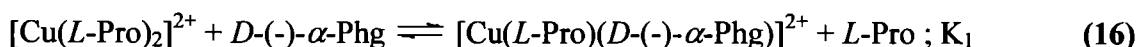
Wyniki badań przeprowadzonych techniką chiralnej chromatografii cienkowsarstwowej oraz badań polarymetrycznych zdają się jednoznacznie wskazywać na to, iż *R*-(-)-flurbiprofen może ulegać oscylacyjnej inwersji chiralnej, po uprzednim rozpuszczeniu w zawierających wodę rozpuszczalnikach niskocząsteczkowych.

Należy dodać, że proces ten wykazuje stosunkowo większą dynamikę w przypadku enancjomeru *R*-(-) niż enancjomeru *S*-(+), co, jak wynika z dotychczasowych badań, wydaje się być regułą dla profenów.

7.4.2. Samorzutna peptyzacja *in vitro* α -fenyloglicyny w środowisku wodnym

7.4.2.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa

Celem niniejszych badań było eksperymentalne stwierdzenie, czy *L*-(+)- α -fenyloglicyna oraz *D*-(-)- α -fenyloglicyna ulegają inwersji chiralnej, czyli przemianie enancjomeru *L*-(+) w *D*-(-) i odwrotnie. Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literaturowego i według naszej najlepszej wiedzy, wyniki prezentowane w tym rozdziale są pierwszą próbą separacji enancjomerów α -fenyloglicyny przy pomocy chiralnej chromatografii cienkowarstwowej. Warunki rozdziału dla układu TLC zostały częściowo zaczerpnięte z publikacji Bhushana i współpracowników [223], którzy opracowali warunki rozdziału chromatograficznego dla antymerów innych aminokwasów, np. fenyloalaniny. Jako fazę stacjonarną wykorzystano gotowe płytki pokryte żel krzemionkowym i zaimpregnowane najpierw roztworem zawierającym jony Cu^{2+} , a następnie roztworem *L*-proliny. Faza ruchoma składała się z *n*-butanolu, acetonitrylu i wody (6:2:3, v/v/v). W tym przypadku rozdział enancjomerów aminokwasu był oparty na mechanizmie kompleksowania, schematycznie przedstawionym poniższymi równaniami:

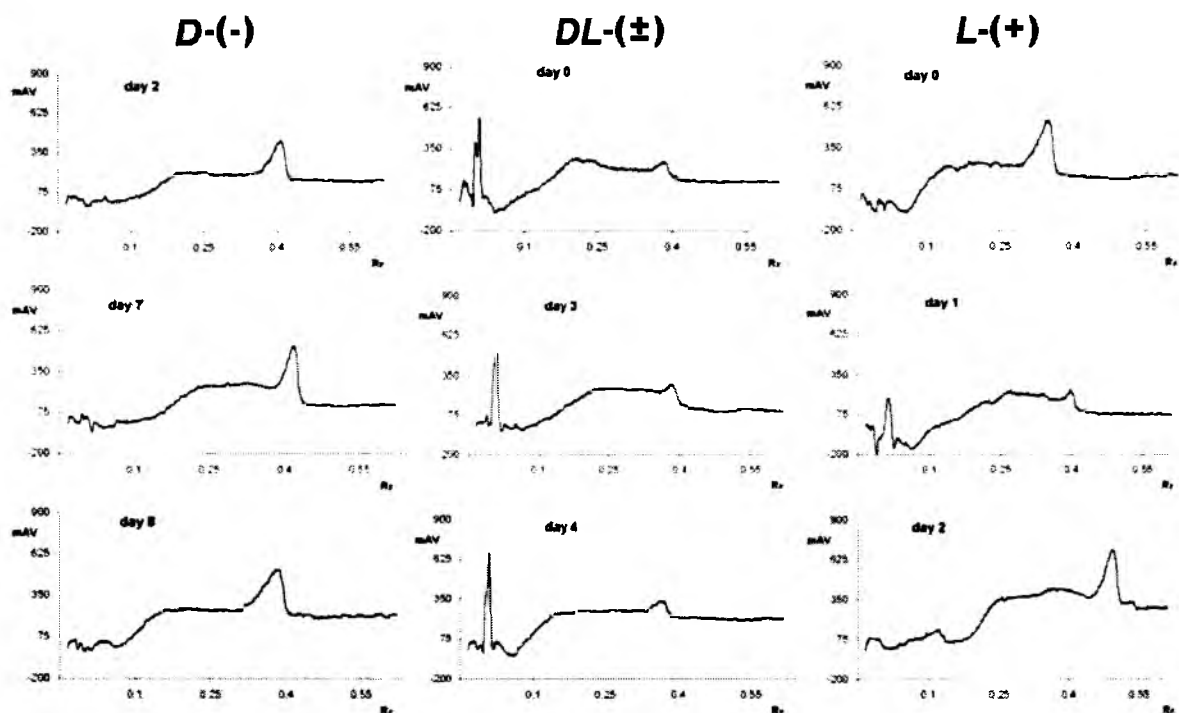


gdzie: *L*-Pro to *L*-prolina, α -Phg to α -fenyloglicyna, K_1 i K_2 przedstawiają stałe równowagi odpowiednich reakcji chelatowania, natomiast nierówność $K_1 \neq K_2$ jest warunkiem rozdziału chromatograficznego dwu antymerów α -fenyloglicyny.

Rozwijanie chromatogramów prowadzono w systemie jednokierunkowym w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Do badań użyto roztworów etanolowo-wodnych (7:3, v/v) czystych enancjomerów oraz racematu i skalematów α -fenyloglicyny, sporządzonych przez zmieszanie optycznie czystych antymerów *L*-(+) i *D*-(-) w stosunkach molowych: 1:1, 0,75:0,25 i 0,25:0,75.

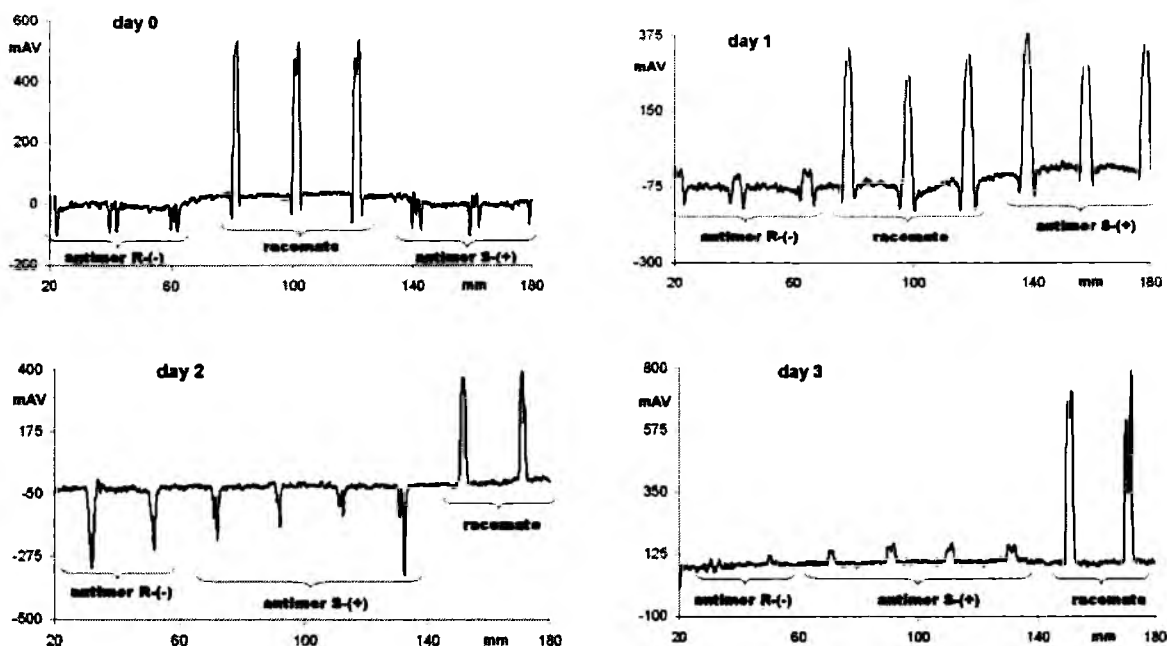
Eksperyment chromatograficzny przyniósł interesujące wyniki. Densytometryczne skanowanie chromatogramów *L*-(+)- α -fenyloglicyny i *D*-(-)- α -fenyloglicyny pokazało, iż oba enancjomery migrują na stosunkowo dużą odległość, dając wartość współczynnika retardacji R_F w granicach 0,39-0,42. Natomiast na densytogramie uzyskanym z mieszaniny racemicznej pojawił się wysoki pik na linii startu oraz bardzo niewielki pik przy $R_F=0,40$. Eksperyment

ten był powtarzany przez 12 dni w odstępach jednodobowych z użyciem tych samych, starzejących się roztworów. Jak widać z Rys. 44, wyniki uzyskane w poszczególnych dniach praktycznie nie różnią się między sobą.



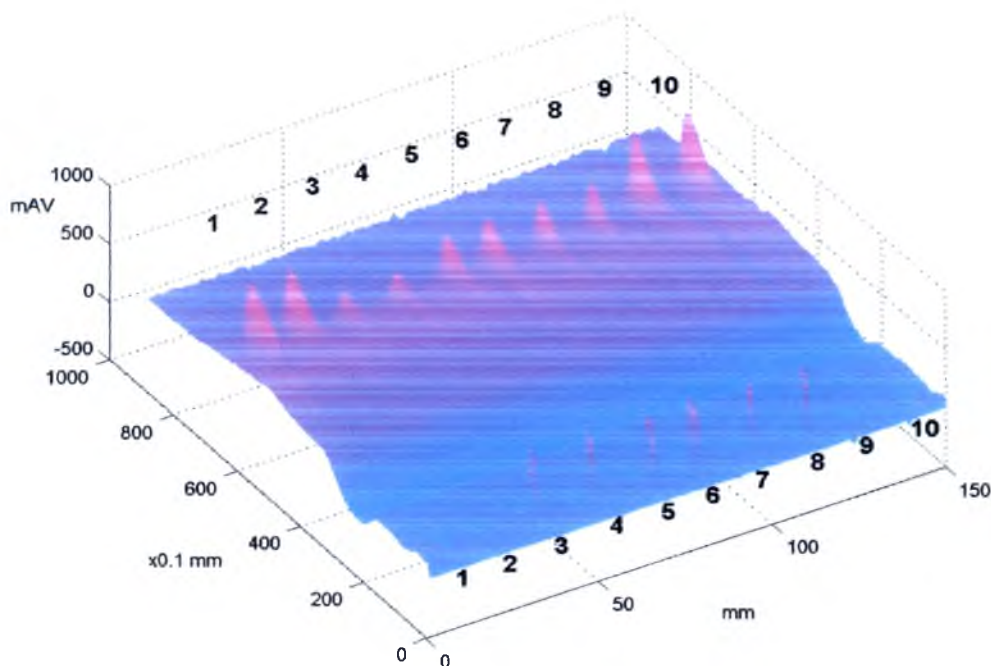
Rys. 44. Densytogramy pokazujące zależność położenia profili stężeniowych $L-(+)\text{-}\alpha$ -fenyloglicyny, $D-(-)\text{-}\alpha$ -fenyloglicyny i $D,L-(\pm)\text{-}\alpha$ -fenyloglicyny od czasu przechowywania odpowiednich próbek [229].

Aby jeszcze silniej podkreślić zaobserwowane zjawisko, wybrane chromatogramy z poszczególnych dni eksperymentu przeskanowano wzdłuż linii startu w kierunku prostopadłym do kierunku rozwijania, co zostało przedstawione na Rys. 45. W ten sposób uzyskano jeszcze bardziej poglądowy obraz tego, iż racemat zostaje unieruchomiony na linii startu. Dodatkowo w przypadku pierwszego i trzeciego dnia eksperymentu $L-(+)\text{-}\alpha$ -fenyloglicyna zachowała się analogicznie do racematu.



Rys. 45. Densytogramy linii startowych dla chromatogramów rozwijanych w dniach 0, 1, 2 i 3 eksperymentu [229].

W celu jeszcze gruntowniejszego zademonstrowania zaobserwowanej sytuacji na jednej płytce rozwinięto etanolowo-wodne roztwory: czystej *D*-(-)- α -fenyloglicyny (linie 1 i 2), czystej *L*-(+)- α -fenyloglicyny (linie 9 i 10), mieszaniny racemicznej *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny (linie 3 i 4) oraz mieszaniny skalemicznej z nadmiarem antymeru *L*-(+) (linie 7 i 8) i mieszaniny skalemicznej z nadmiarem antymeru *D*-(-) (linie 5 i 6). Uzyskane wyniki przedstawiono na Rys. 46. Zarówno czysta *D*-(-)- α -fenyloglicyna, jak i czysta *L*-(+)- α -fenyloglicyna migrują stosunkowo wysoko, w przeciwieństwie do racemicznych i skalemicznych roztworów fenyloglicyny. Przeważające ilości racematu *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny pozostają na linii startowej. Dwa skalematy zachowują się podobnie do racematu i jest prawdopodobne, że równomolowe ilości enancjomeru *L*-(+) i *D*-(-) tworzą oligopeptyd, który pozostaje na starcie, natomiast nadmiar enancjomeru *D*-(-) lub enancjomeru *L*-(+) migruje wzdłuż płytki.

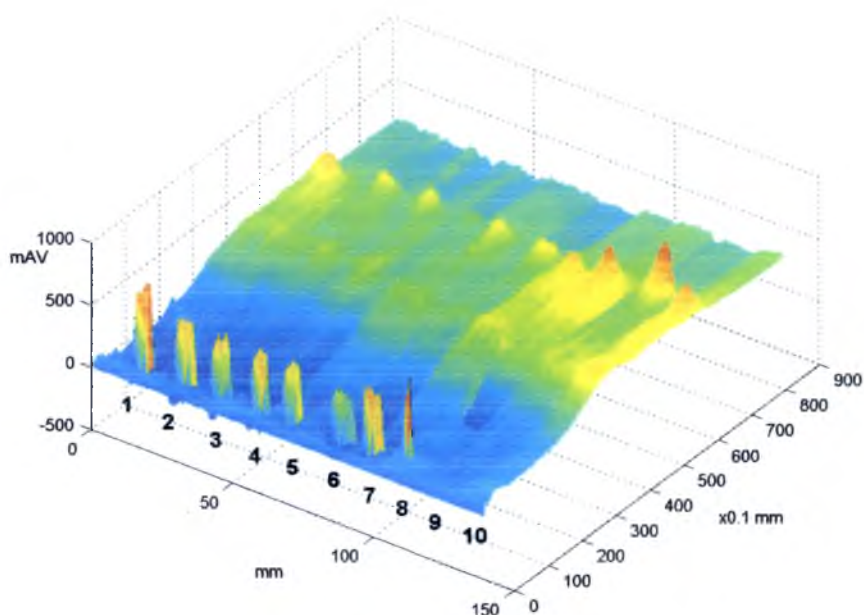


Rys. 46. Trójwymiarowy densytogram pokazujący pozycję na chromatogramie profili stężeniowych dla czystej *D*-(-)- α -fenyloglicyny (linie 1 i 2), czystej *L*-(+)- α -fenyloglicyny (linie 9 i 10), mieszaniny racemicznej *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny (linie 3 i 4) oraz mieszaniny skalemicznej z nadmiarem antymeru *L*-(+) (linie 7 i 8) i mieszaniny skalemicznej z nadmiarem antymeru *D*-(-) (linie 5 i 6) [229].

Otrzymane wyniki sugerują, że racemat *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny ulega prawie natychmiastowej peptyzacji, ponieważ większa masa cząsteczkowa utworzonego peptydu uniemożliwia mu opuszczenie miejsca naniesienia próbki.

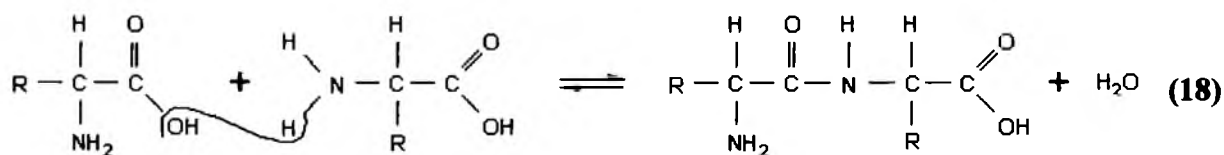
Należy uwzględnić fakt, że dodatkowy wpływ na peptyzację wywierają odwadniające właściwości żelu krzemionkowego, którym pokryta jest płytka, co najprawdopodobniej ułatwia tworzenie wiązań peptydowych między kolejnymi cząsteczkami aminokwasów.

Aby zbadać wymienione właściwości żelu krzemionkowego przeprowadzono następujący eksperyment. Sporządzono 10 roztworów racematów *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny stosując jako rozpuszczalnik: 1) wodę redestylowaną, 2) mieszaninę etanol-woda (1:9, v/v), 3) mieszaninę etanol-woda (2:8, v/v), 4) mieszaninę etanol-woda (3:7, v/v), 5) mieszaninę etanol-woda (4:6, v/v), 6) mieszaninę etanol-woda (5:5, v/v), 7) mieszaninę etanol-woda (6:4, v/v), 8) mieszaninę etanol-woda (7:3, v/v), 9) mieszaninę etanol-woda (9,5:0,5, v/v), oraz 10) etanol absolutny. Wszystkie te roztwory rozwinięto na jednej płytce chromatograficznej, a uzyskane wyniki pokazano na Rys. 47.



Rys. 47. Trójwymiarowy densytogram pokazujący pozycję na chromatogramie profili stężeniowych dla racematu *D,L*-(±)- α -fenyloglicyny rozpuszczonego w następujących rozpuszczalnikach: 1) woda redestylowana, 2) etanol-woda (1:9, v/v), 3) etanol-woda (2:8, v/v), 4) etanol-woda (3:7, v/v), 5) etanol-woda (4:6, v/v), 6) etanol-woda (5:5, v/v), 7) etanol-woda (6:4, v/v), 8) etanol-woda (7:3, v/v), 9) etanol-woda (9,5:0,5, v/v), 10) etanol absolutny.

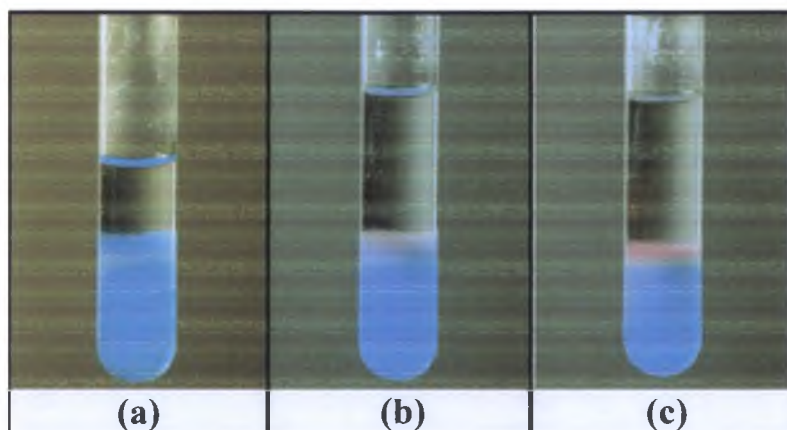
Podczas reakcji peptyzacji dochodzi do heterolitycznego rozpadu określonych wiązań, co obecność wody jako rozpuszczalnika ułatwia, pomimo iż z równania (18) wynika, że dodawanie wody cofa polikondensację [230]:



Na Rys. 47 można zaobserwować, iż dla roztworu zupełnie bezwodnego (linia 10) oraz tego z niewielką ilością wody (linia 9) brak jest dowodu na zachodzenie peptyzacji, a mianowicie brak jest piku w miejscu naniesienia próbki. Dodatkowo w przypadku linii 9 zadziałały odwadniające właściwości żelu krzemionkowego.

7.4.2.2. Test biuretowy

Aby rozważyć, czy peptyzacja zachodzi tylko na stałej powierzchni żelu krzemionkowego, czy również w roztworze, wykonano test biuretowy. Trzy roztwory: *D*-(-)- α -fenyloglicyny, *L*-(+)- α -fenyloglicyny i racematu *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym (7:3, v/v) po trzech dniach przechowywania zmieszano z odczynnikiem biuretowym. Wyniki przedstawiono na Rys. 48. W każdej z trzech probówek zaobserwowano różowo-fioletową warstwę, która jest charakterystyczna dla występowania wiązania peptydowego w peptydach i białkach. Uzyskana wydajność peptyzacji była jednak inna w każdej z probówek. Najciemniejszy kolor różowo-fioletowy odpowiada racematowi (Rys. 48c). Tutaj obecność wiązań peptydowych jest największa i zmniejsza się systematycznie przez *L*-(+)- α -fenyloglicynę (Rys. 48b) do *D*-(-)- α -fenyloglicyny (Rys. 48a).



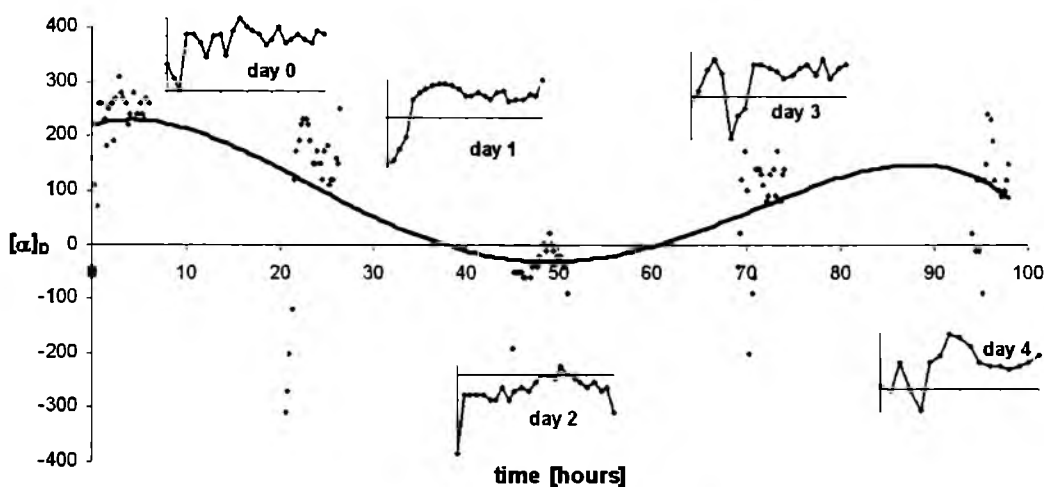
Rys. 48. Zdjęcia zawartości probówek po przeprowadzeniu reakcji biuretovej w roztworze etanolowo-wodnym (7:3, v/v) (a) *D*-(-)- α -fenyloglicyny, (b) *L*-(+)- α -fenyloglicyny i (c) *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny po 3 dniach przechowywania odpowiednich próbek [229,231].

Wynik testu biuretovej dodatkowo potwierdza osiągnięte wcześniej rezultaty chromatograficzne. Porównanie braku chromatograficznej mobilności racematu *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny, z najbardziej intensywnym kolorem w probówce, jest dowodem prawie natychmiastowej peptyzacji równomolowych ilości antymerów. Pojawienie się pików *L*-(+)- α -fenyloglicyny w punkcie startowym w pierwszym i trzecim dniu przechowywania próbki (Rys. 45) odzwierciedla zachodzenie peptyzacji na dużo mniejszą skalę. Jest to być może wynik wstępnej inwersji chiralnej *L*-(+)- α -fenyloglicyny do antymeru *D*-(-), a następnie peptyzacji równomolowych ilości obu antymerów.

7.4.2.3. Polarymetria

Badania zmian skręcalności właściwej L -(+)- α -fenyloglicyny były przeprowadzone w dwóch seriach doświadczeń.

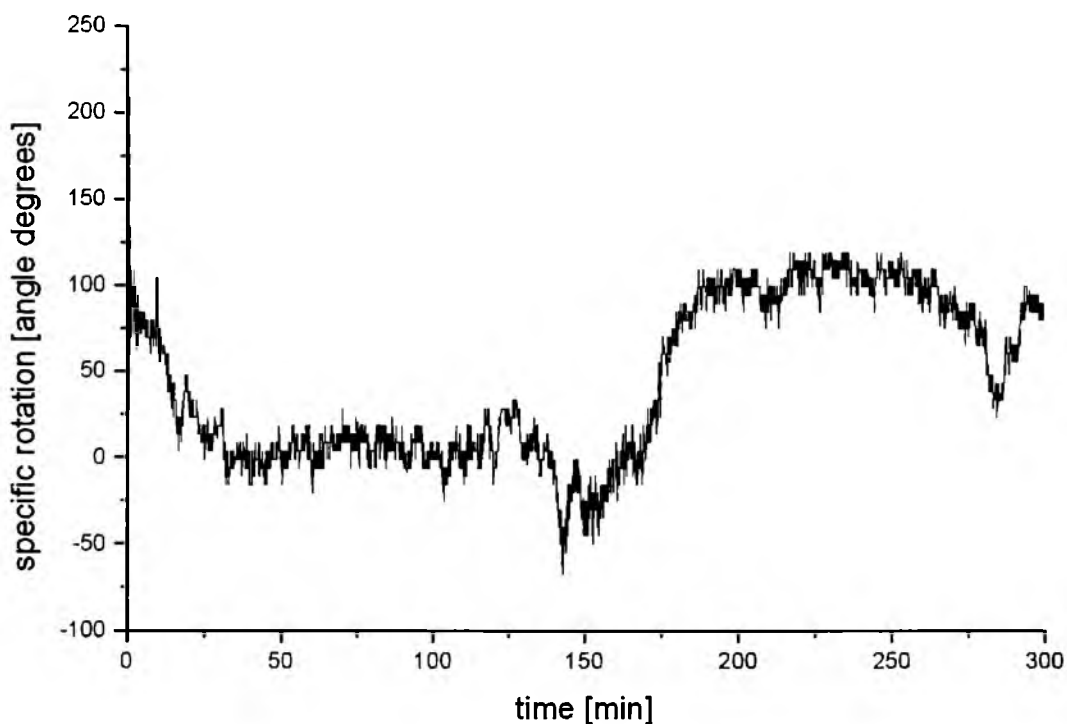
W pierwszym doświadczeniu rejestrowano zmiany skręcalności właściwej L -(+)- α -fenyloglicyny rozpuszczonej w mieszaninie etanolowo-wodnej, przechowywanej przez 4 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Były one rejestrowane w sposób nieciągły prawie codziennie, po kilka godzin dziennie w 15-minutowych odstępach czasu. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rys. 49.



Rys. 49. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla L -(+)- α -fenyloglicyny rozpuszczonej w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Główny kierunek zmian jest zaznaczony linią ciągłą, a wykresy w „okienkach” obrazują zmiany zachodzące w wybranych dniach przeprowadzanego eksperymentu.

Dane umieszczone na Rys. 49 pokazują, iż zmiany skręcalności właściwej były z natury oscylacyjne, co jest wyraźnie widoczne w „okienkach” zamieszczonych na tym rysunku i w przebiegu linii głównej. Długoterminowy trend zmian wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ wskazuje na postępujący proces racemizacji L -(+)- α -fenyloglicyny, a nawet na całkowitą inwersję chiralną do jej antymeru D -(-). W tym przypadku racemizacja następuje już po 20 godzinach przechowywania roztworu.

W drugim eksperymencie polarymetrycznym rejestrację oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej przeprowadzono w sposób ciągły, również w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ przez pierwszych 5 godzin od chwili sporządzenia roztworu L -(+)- α -fenyloglicyny w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym. Uzyskany wynik przedstawiono na Rys. 50.

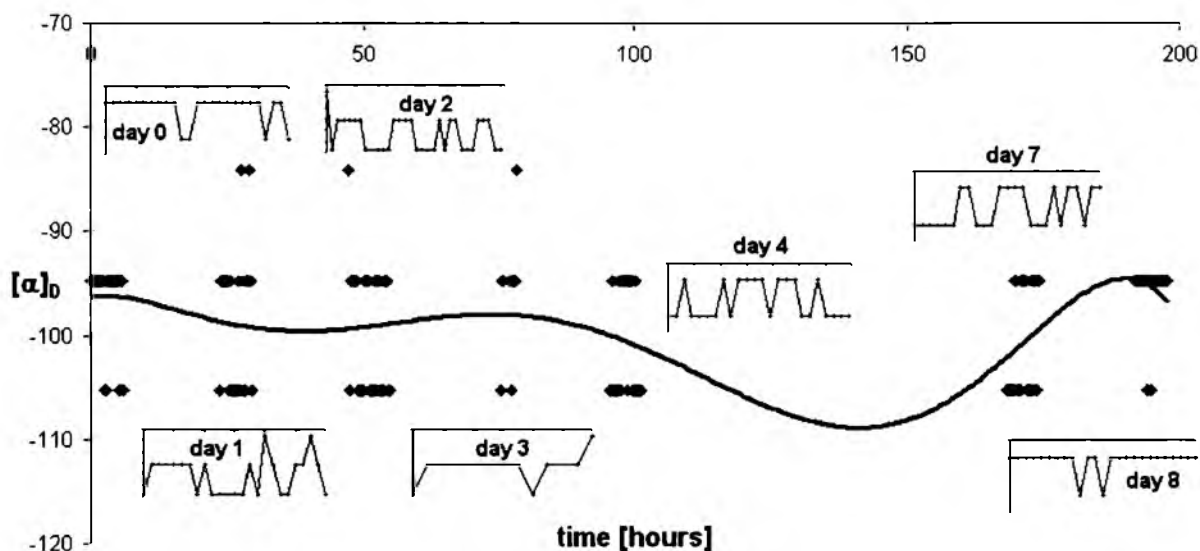


Rys. 50. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla L -(+)- α -fenyloglicyny rozpuszczonej w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ [231].

Wynik ciągłej rejestracji zmian skręcalności właściwej roztworu L -(+)- α -fenyloglicyny w funkcji czasu stanowi kolejny dobitny dowód na to, iż zmiany te mają charakter oscylacyjny. Rezultat pomiarów polarymetrycznych dodatkowo potwierdza wyniki badań chromatograficznych i testu biuretowego, zgodnie z którymi L -(+)- α -fenyloglicyna ulega inwersji chiralnej, której najprawdopodobniej towarzyszy samorzutna polikondensacja.

Badania zmian skręcalności właściwej $D(-)\text{-}\alpha$ -fenyloglicyny były przeprowadzone w dwóch seriach doświadczeń, podobnie jak dla jego antymery.

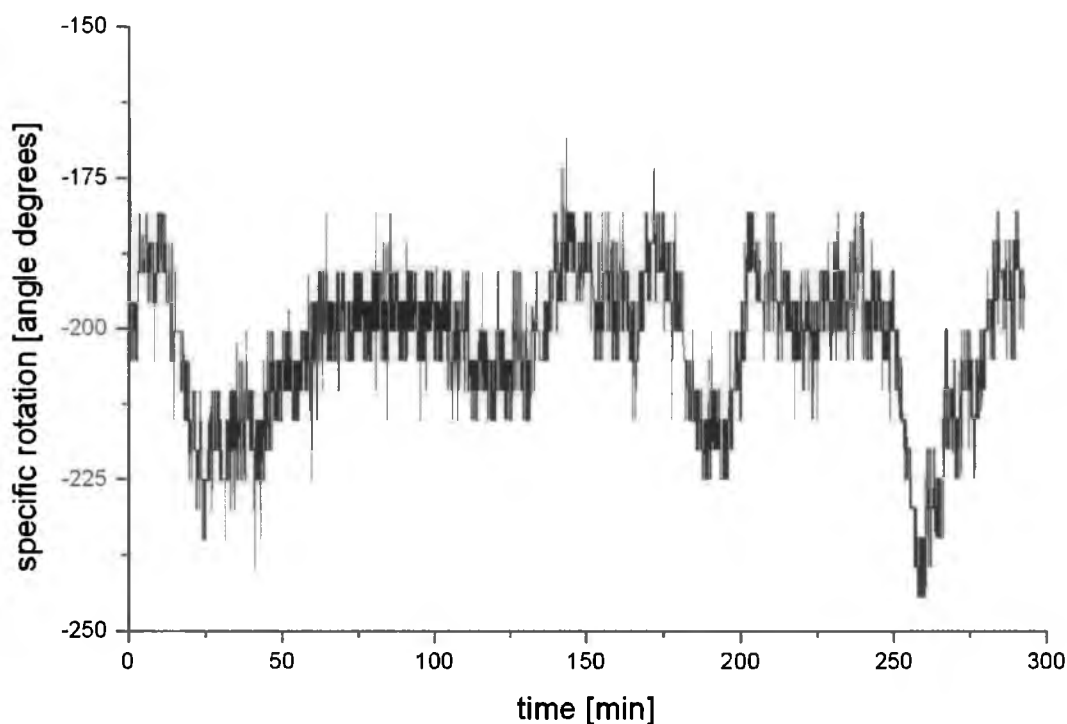
W pierwszym doświadczeniu zmiany skręcalności właściwej $D(-)\text{-}\alpha$ -fenyloglicyny rozpuszczonej w mieszaninie etanolowo-wodnej, przechowywanej przez 8 dni w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$, były rejestrowane w sposób nieciągły prawie codziennie, po kilka godzin dziennie w 15-minutowych odstępach czasu. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rys. 51.



Rys. 51. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla $D(-)\text{-}\alpha$ -fenyloglicyny rozpuszczonej w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$. Główny kierunek zmian jest zaznaczony linią ciągłą, a wykresy w „okienkach” obrazują zmiany zachodzące w wybranych dniach przeprowadzanego eksperymentu [229].

Dane zamieszczone na Rys. 51 pokazują, iż zmiany skręcalności właściwej były z natury oscylacyjne, co jest widoczne w „okienkach” zamieszczonych na tym rysunku i w przebiegu linii głównej. Jednak w przeciwieństwie do swojego antymery $L(+)$, $D(-)\text{-}\alpha$ -fenyloglicyna nie ulega szybkiej racemizacji, co wynika z powyższego wykresu.

W drugim eksperymencie polarymetrycznym rejestrację oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej przeprowadzono w sposób ciągły, również w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$ przez pierwszych 5 godzin od chwili sporządzenia roztworu $D(-)\text{-}\alpha$ -fenyloglicyny w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym. Uzyskany wynik przedstawiono na Rys. 52.



Rys. 52. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla *D*-(-)- α -fenyloglicyny rozpuszczonej w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Wynik ciągłej rejestracji zmian skręcalności właściwej roztworu *D*-(-)- α -fenyloglicyny w funkcji czasu dodatkowo potwierdza, iż zmiany te mają charakter oscylacyjny.

Tak, więc wyniki badań przeprowadzonych techniką chiralnej chromatografii cienkowarstwowej oraz badań polarymetrycznych zdają się jednoznacznie wskazywać na to, iż *D*-(-)- α -fenyloglicyna może ulegać oscylacyjnej inwersji chiralnej, po uprzednim rozpuszczeniu w zawierającym wodę rozpuszczalniku niskocząsteczkowym.

7.4.2.4. Test mikrobiologiczny

Celem sprawdzenia, czy pozytywny wynik reakcji biurekowej nie jest spowodowany obecnością mikroorganizmów w badanych roztworach, przeprowadzono test mikrobiologiczny. Został on wykonany dla roztworów etanolowo-wodnych *L*-(+)- i *D*-(-)- α -fenyloglicyny, wcześniej przechowywanych przez okres jednego roku w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$ dwiema metodami.

Pierwsza metoda polegała na wprowadzeniu roztworów obu antymerów α -fenyloglicyny do pożywki stałej i do pożywki ciekłej. Pierwszą serię próbek poddano 7-dniowej inkubacji w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$, a drugą z nich 14-dniowej inkubacji z ciągłym mieszaniem z szybkością 260 obrotów mieszadła na minutę, również w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$. Obserwacje badanych preparatów prowadzono pod mikroskopem.

Jako drugą zastosowano metodę Bradforda na oznaczanie zawartości białka, a konkretnie DNA, w próbkach. Roztwory antymerów α -fenyloglicyny zmieszano z odczynnikiem Bradforda i spektrofotometrycznie mierzono ich absorbancję przy długości fali świetlnej 260 nm.

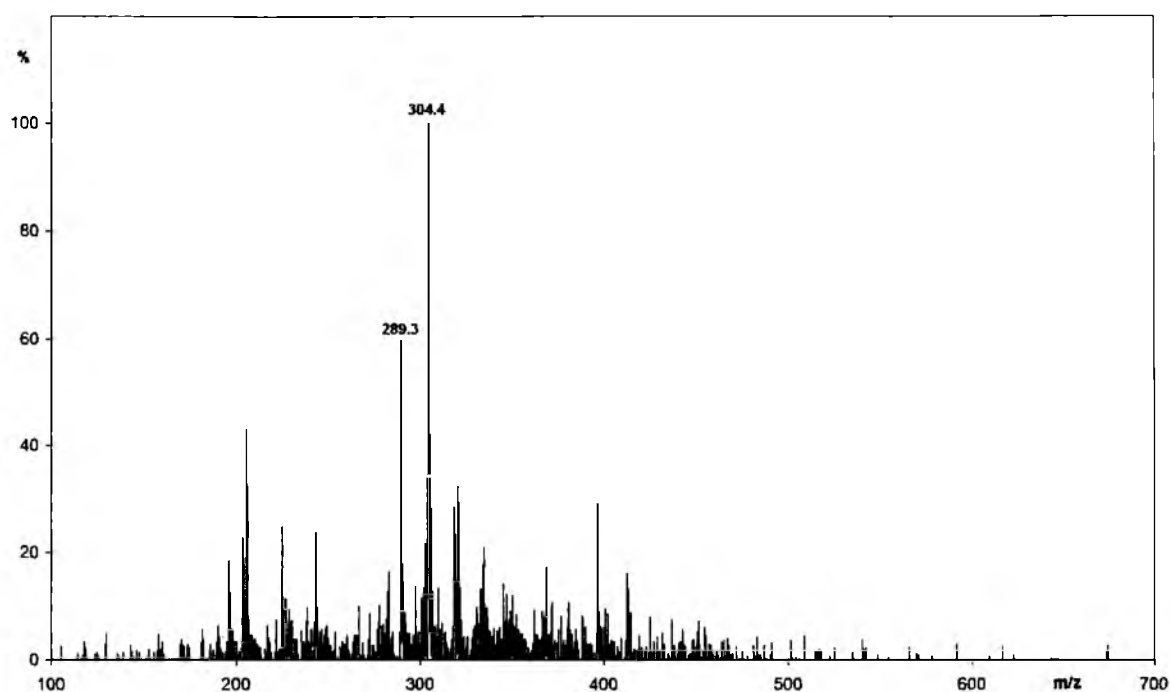
Żadna z zastosowanych metod nie dała pozytywnego wyniku, a więc nie zaobserwowano pojawienia się mikroorganizmów na pożywkach, ani też obecności DNA w badanych roztworach. Tak więc wynik przeprowadzonego testu mikrobiologicznego dodatkowo nas upewnił, iż w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym dochodzi do samorzutnego powstawania oligomerów α -fenyloglicyny, ale nawet przy długotrwałym przechowywaniu badanych roztworów tworzenie wyższych agregatów nie ma miejsca.

7.4.2.5. Achiralna wysokosprawna chromatografia cieczowa

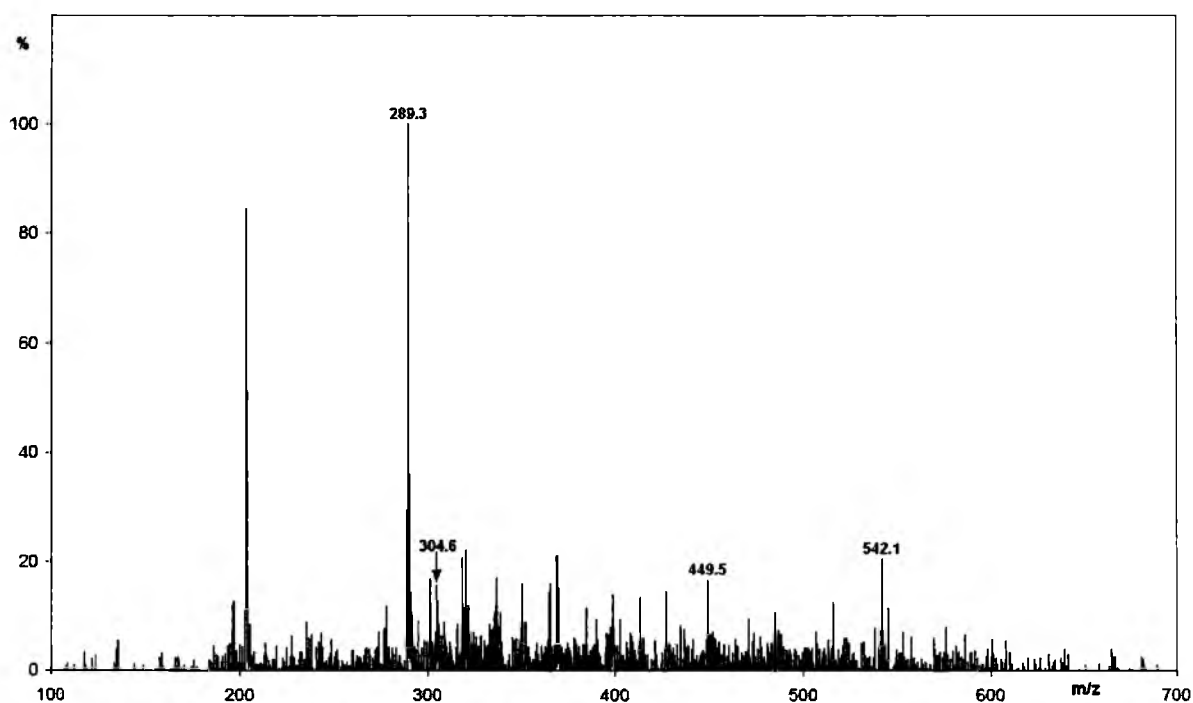
Kolejnym krokiem badawczym było prześledzenie dynamiki procesu peptyzacji α -fenyloglicyny ze względu na jego znaczenie w procesach biochemicznych, w tym w procesach ewolucyjnych. Inspiracją do tego były prace Ivanova i współpracowników [232,233], w których autorzy udokumentowali oscylacyjną polikondensację organosilanoli (np. $R_2Si(OH)_2$ oraz $RR'Si(OH)_2$), a które w pewnych aspektach były zbieżne z badaniami prezentowanymi w niniejszej pracy. Do naszych badań użyto świeżo sporządzonych oraz przechowywanych przez okres kilku dni i jednego roku roztworów etanolowo-wodnych (7:3, v/v) czystych enancjomerów i racematu α -fenyloglicyny (sporządzonego przez zmieszanie optycznie czystych antymerów $L-(+)$ i $D-(-)$ w stosunku molowym 1:1). Technikami wykorzystanymi do śledzenia samorzutnej peptyzacji α -fenyloglicyny były spektrometria masowa (MS) oraz achiralna wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa z detekcją na matrycy fotodiodowej (HPLC-DAD). Widma masowe były rejestrowane dla całej objętości próbki bez jej wstępnego rozdziłu chromatograficznego.

Na Rys. 53 przedstawiono widma masowe dla świeżego i przechowywanego przez okres jednego roku roztworu $L-(+)$ - α -fenyloglicyny. Jeśli te widma potraktować jako fingerprinty, to są one wyraźnie odmienne. Widmo MS rocznej próbki (Rys. 53b) jest bogatsze w sygnały, niż widmo próbki świeżej (Rys. 53a). W widmie świeżej próbki dominujący pik występuje przy $m/z=304$ i można go przypisać kationowi $[Phg_2+He]^+$ (gdzie Phg_2 oznacza cykliczny dimer α -fenyloglicyny), natomiast w widmie jednorocznej próbki wzmiankowany kation ma znacznie mniejszy udział względny. W próbce jednorocznej pik występujący przy $m/z=289$ jest z kolei dominujący i można go przypisać kationowi $[Phg_2-NH+He]^+$ (pochodzącemu od dimeru α -fenyloglicyny), chociaż pojawia się on także w próbce świeżej. Zanikanie piku przy $m/z=304$ oraz dominacja piku przy $m/z=289$ w widmie rocznego roztworu $L-(+)$ - α -fenyloglicyny jest symptomem starzenia się tego aminokwasu. Innym znaczącym symptomem jest obecność w widmie jednorocznej próbki stosunkowo silnych sygnałów o wyższych wartościach m/z , niż te, które obserwujemy w próbce świeżej, tj. $m/z=449$ i 542 , co może wyraźnie świadczyć o obecności oligopeptydów w próbce postarzałego roztworu

(a)



(b)



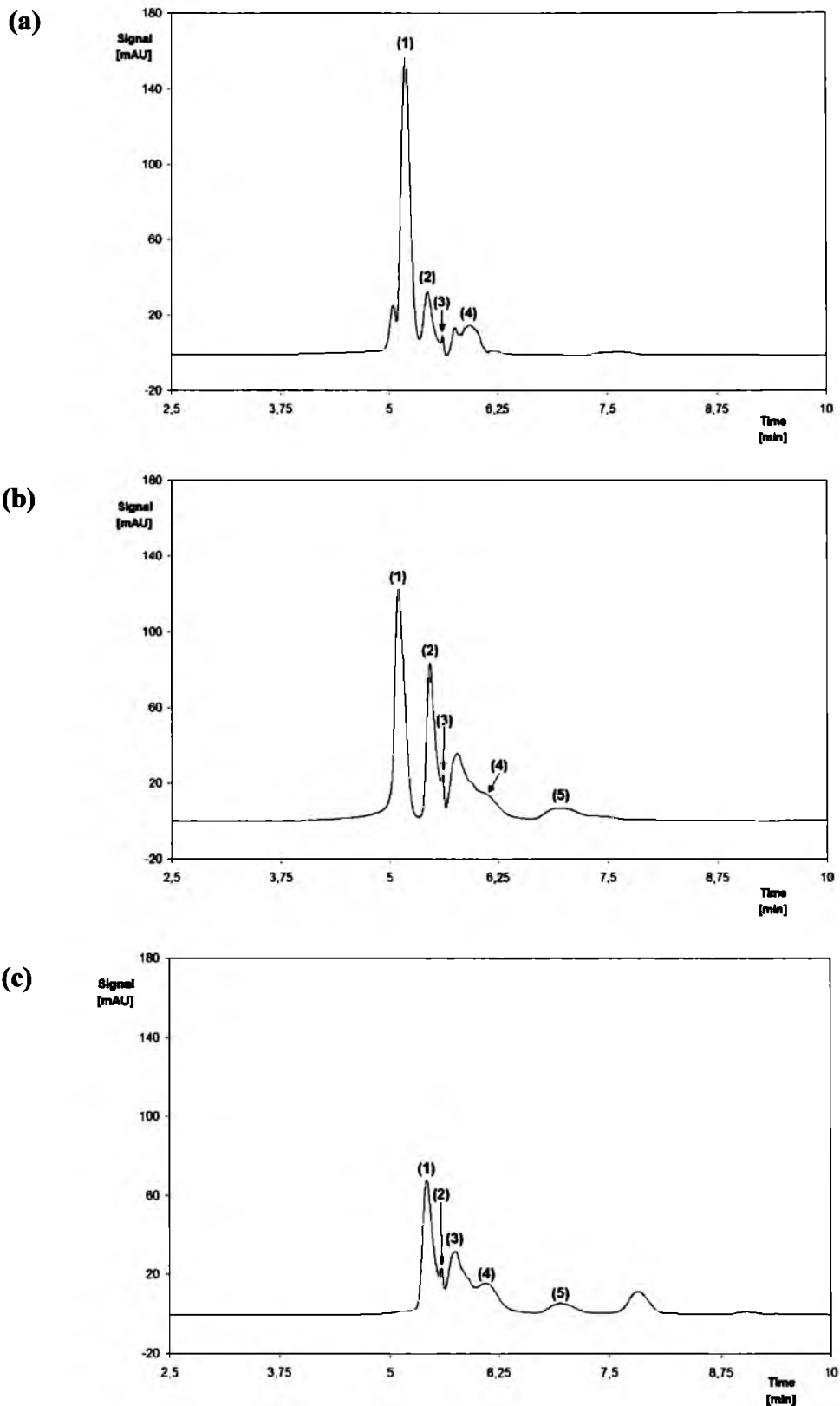
Rys. 53. Widma masowe *L*-(+)- α -fenyloglicyny rozpuszczonej w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, zarejestrowane dla (a) świeżej próbki i (b) próbki przechowywanej przez okres jednego roku w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ [234].

W eksperymencie z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD śledzono pojawianie się i zmiany stężenia określonych indywiduów chemicznych podczas procesu starzenia się etanolowo-wodnego roztworu *L*-(+)- α -fenyloglicyny. Na Rys. 54 porównano chromatogram świeżo sporządzonego roztworu *L*-(+)- α -fenyloglicyny z chromatogramami otrzymanymi dla roztworów przechowywanych przez okres 9 dni i jednego roku. Piki obecne na wszystkich chromatogramach i oznaczone jako 1 i 2, z czasami retencji odpowiednio 5,2 i 5,4 minuty, prawdopodobnie odpowiadają dwóm różnym formom dimerycznym α -fenyloglicyny, w których monomery są połączone ze sobą wiązaniami wodorowymi. Za takim wnioskiem przemawiają następujące fakty:

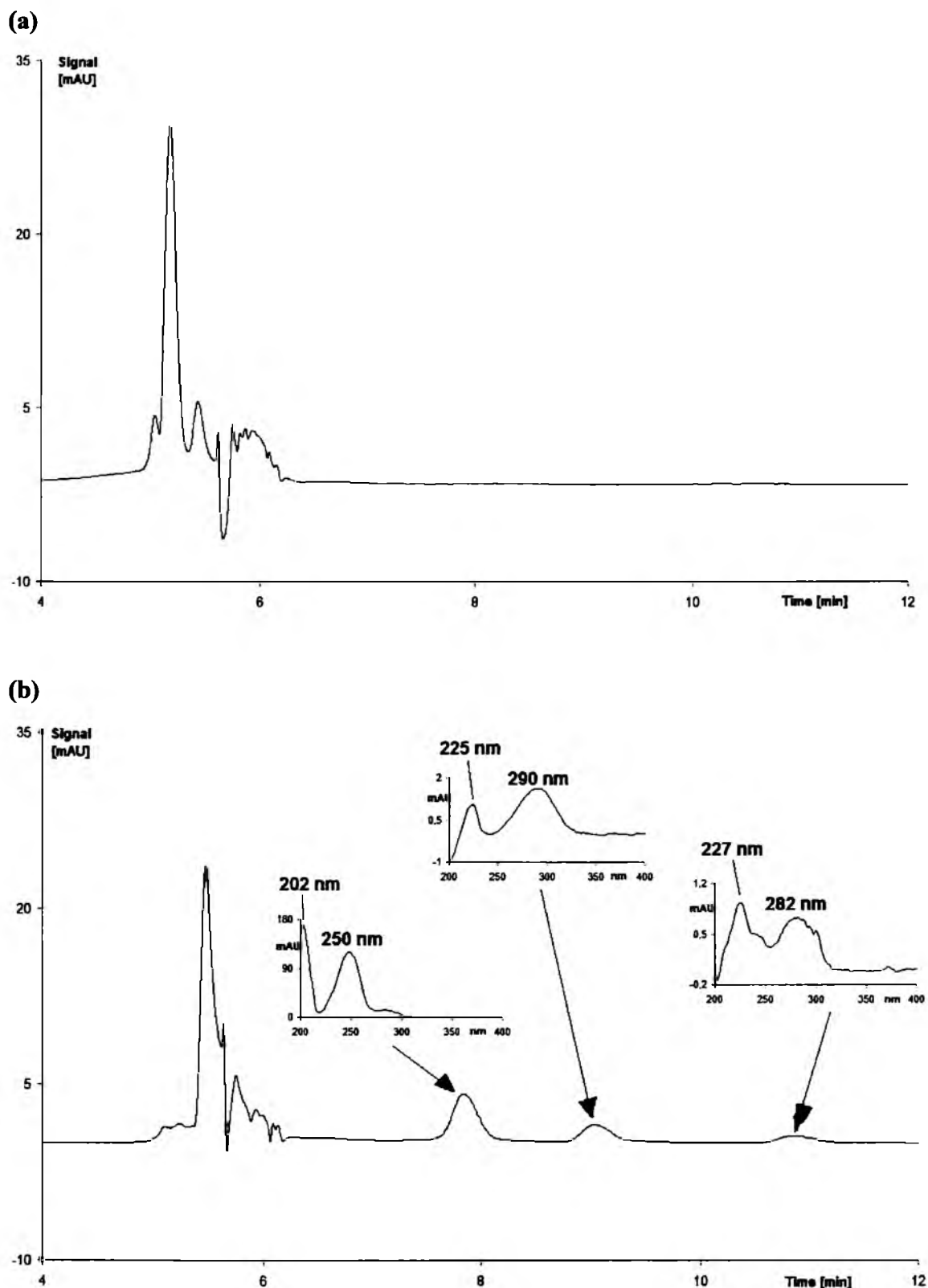
- piki 1 i 2 posiadają bardzo zbliżne czasy retencji na każdym z prezentowanych chromatogramów (Rys. 54), co sugeruje duże podobieństwo odpowiednich indywiduów we właściwościach chemicznych,
- piki te dominują na chromatogramie otrzymanym dla świeżo sporządzonego roztworu *L*-(+)- α -fenyloglicyny, natomiast
- ich intensywności maleją wraz z rosnącym czasem przechowywania roztworu *L*-(+)- α -fenyloglicyny, co może wskazywać na konsumpcję substancji wyjściowej w wyniku procesu peptyzacji.

Dodatkowo za taką hipotezą przemawiają wcześniej wzmiankowane sygnały o wartościach $m/z=289$ i 304 (Rys. 53). Piki o wyższych czasach retencji (3, 4 i 5) można przypisać większym agregatom, takim, jak oligopeptydy, tworzącym się podczas starzenia się próbki, za czym również przemawia widmo MS postarzałego roztworu *L*-(+)- α -fenyloglicyny oraz wynik testu biuretowego (Rys. 48).

Rys. 55 ukazuje piki o jeszcze wyższych czasach retencji, nieobecne na chromatogramach próbek świeżych, a nawet próbek kilkudniowych. Może to oznaczać, iż tworzenie się wyższych oligopeptydów to proces bardzo powolny, trwający nawet kilka miesięcy. Widma UV niektórych pików obecnych na chromatogramie (Rys. 55b) ukazują pewne przesunięcia batochromowe, co sugerowałoby, iż piki te o stosunkowo wysokich czasach retencji pochodzą od oligopeptydów o coraz większej ilości związanych jednostek monomerycznych.



Rys. 54. Chromatogramy *L*-(+)- α -fenyloglicyny rozpuszczonej w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, zarejestrowane przy długości fali 275 nm dla: **(a)** świeżej próbki, **(b)** próbki przechowywanej przez okres 9 dni i **(c)** próbki przechowywanej przez okres jednego roku w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ [234].



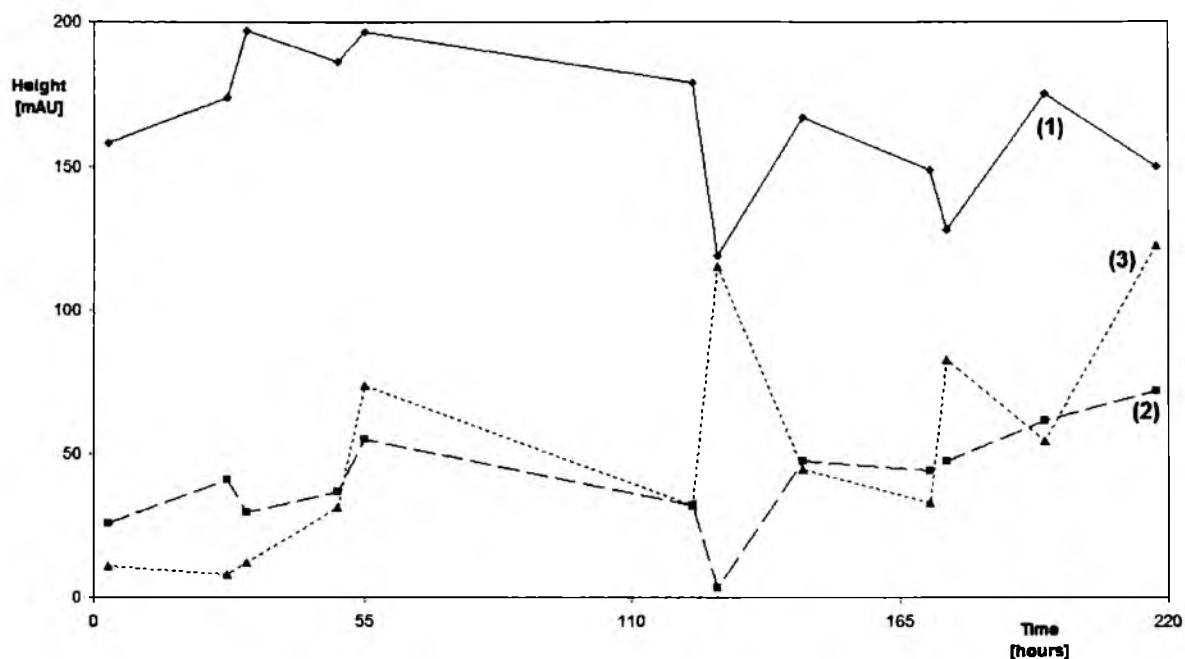
Rys. 55. Chromatogramy *L*-(+)- α -fenyloglicyny rozpuszczonej w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, zarejestrowane przy długości fali 300 nm dla **(a)** świeżej próbki i **(b)** próbki przechowywanej przez okres jednego roku w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Na chromatogramie (b) dodatkowo zamieszczono widma UV zarejestrowane dla wskazanych pików [234].

Kolejno starano się stwierdzić, czy wzrost stężenia produktów kondensacji *L*-(+)- α -fenyloglicyny zachodzi w sposób monotoniczny, czy też oscylacyjny. W tym celu sporządzono wykres zmian wysokości poszczególnych pików na chromatogramach rejestrowanych przy długości fali 275 nm dla starzejącego się, etanolowo-wodnego roztworu *L*-(+)- α -fenyloglicyny, wysokości te są bowiem proporcjonalne do odpowiednich stężeń przypisywanych im peptydów. Na Rys. 56 przedstawiono zmiany wysokości pików 1-5 (numery jak na Rys. 54) w zależności od czasu przechowywania roztworu α -fenyloglicyny. Wyraźnie widać, iż wysokości pików zmieniają się w sposób niemonotoniczny, co wskazuje na oscylacyjną naturę procesu kondensacji.

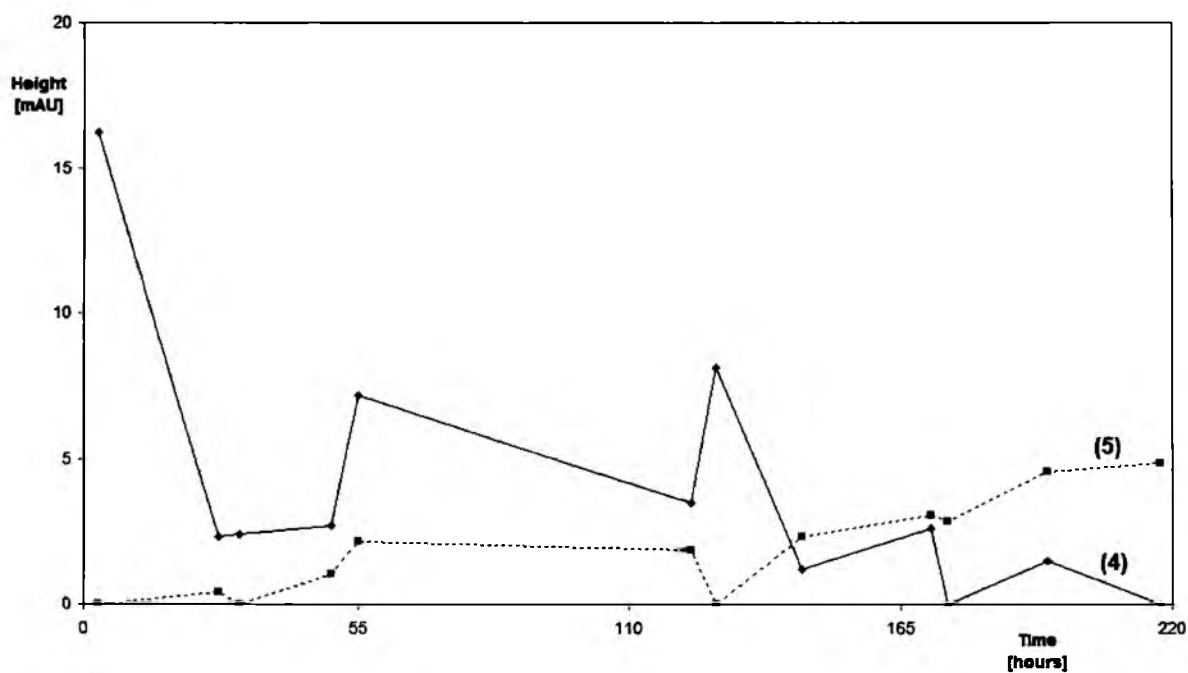
Z Rys. 56a wynika, że wysokość pik 1 początkowo w sposób nieliniowy rośnie, co może być skutkiem hydrolizy śladowych ilości oligopeptydów zanieczyszczających komercyjną *L*-(+)- α -fenyloglicynę (patrz Rys. 54a). Po około 110 godzinach wysokość pik 1 zaczyna maleć w sposób oscylacyjny, co może wynikać ze konsumpcji aminokwasu w procesie peptyzacji. Efekt ten pozostaje w zgodzie ze spadkiem wysokości pik 1, przedstawionym na Rys. 54b i c. Wysokość pik 2 rośnie przez okres 9 dni trwania eksperymentu (Rys. 56a). To zachowanie również może wynikać z hydrolizy śladowych zanieczyszczeń oligopeptydowych lub też z konwersji dwóch dimerycznych form α -fenyloglicyny, reprezentowanych na chromatogramach jako piki 1 i 2 (Rys. 54), jednakże po roku trwania eksperymentu pik 2 staje się całkiem nieznaczny (Rys. 54c). Ten spadek wysokości można przypisać konsumpcji aminokwasu w procesie peptyzacji. Piki 3, 4 i 5 można przypisać oligopeptydom praktycznie od początku obecnym w etanolowo-wodnym roztworze *L*-(+)- α -fenyloglicyny. W czasie 9 dni trwania eksperymentu wysokości pików 3 i 5 wzrastają w sposób oscylacyjny, a wysokość pik 4 spada niemonotonicznie (Rys. 56), natomiast długoterminowa obserwacja wartości wysokości pików 3, 4 i 5 wskazuje na powolny wzrost stężenia odpowiednich oligopeptydów (Rys. 54).

Badania związków stabilnych z zastosowaniem dokładnie tych samych warunków chromatograficznych, co w przypadku *L*-(+)- α -fenyloglicyny, skutkują otrzymaniem współczynnika korelacji liniowej r dla krzywej kalibracji utworzonej na podstawie wysokości pików chromatograficznych zawsze wynoszącego $r \geq 0,99$. Ponadto błąd procentowy dla każdej wartości wysokości pik związku stabilnego nie przekracza 5%.

(a)

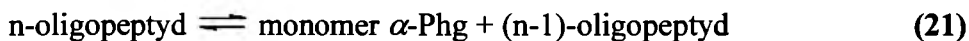
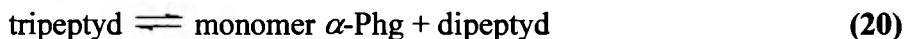


(b)



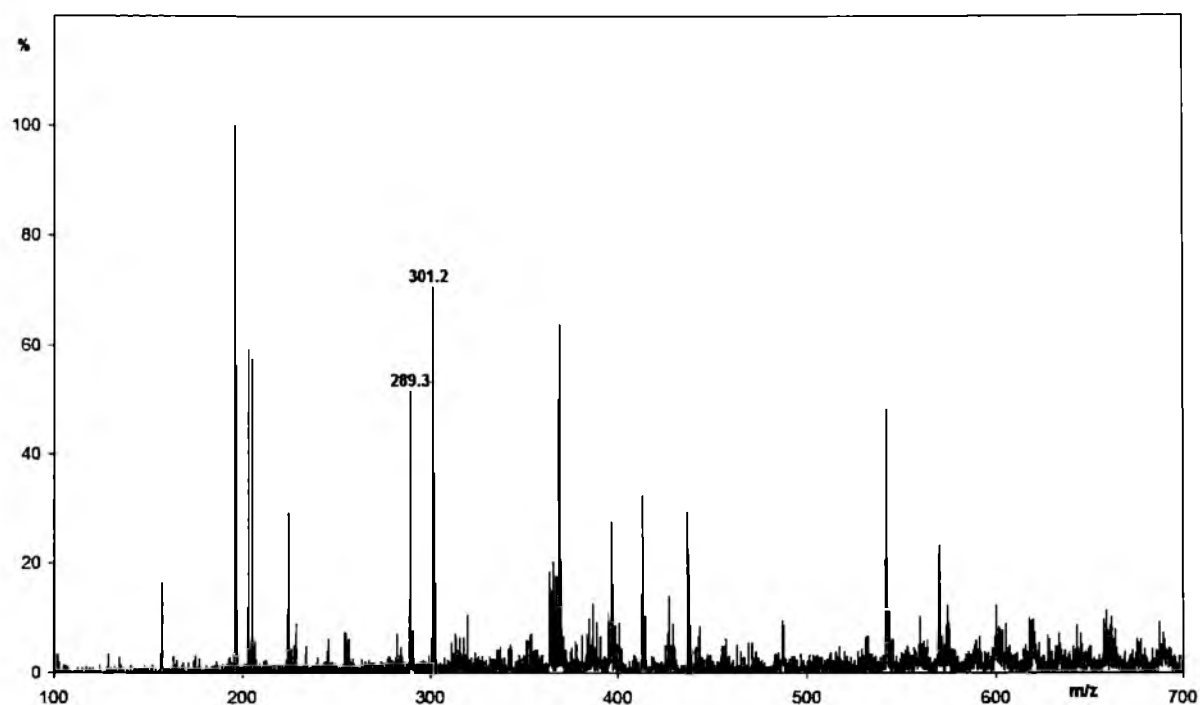
Rys. 56. Zmiany wysokości pików chromatograficznych dla *L*-(+)- α -fenyloglicyny rozpuszczonej w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3 i przechowywanej przez okres 9 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. (a) Krzywe zmian dla pików 1 ($t_R=5,2$ min), 2 ($t_R=5,4$ min) i 3 ($t_R=5,6$ min) oraz (b) krzywe zmian dla pików 4 ($t_R=6,0$ min) i 5 ($t_R=6,9$ min) odpowiadają analogicznie numerowanym pikom chromatograficznym na Rys. 54 [234].

Wyniki graficznie przedstawione na Rys. 56 świadczą o oscylacyjnej naturze procesu peptyzacji *L*-(+)- α -fenyloglicyny, który można zilustrować przy pomocy poniższych, schematycznych równań:

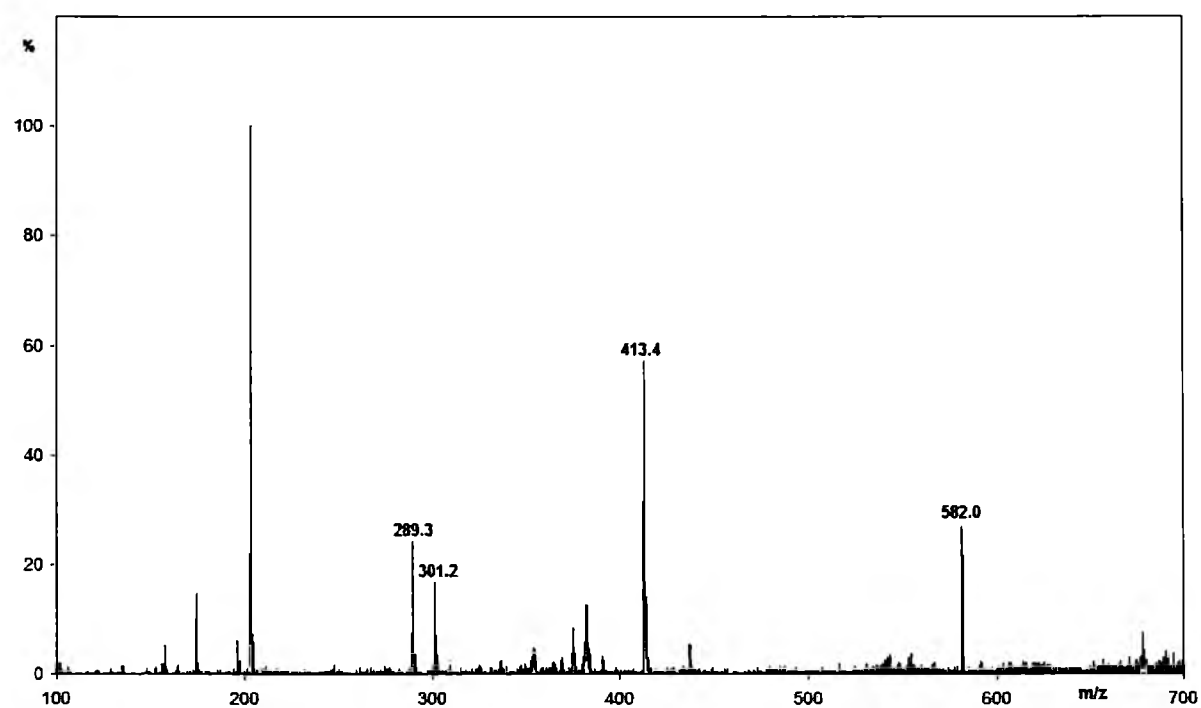


Analogiczne badania technikami MS i HPLC-DAD przeprowadzono również dla próbek *D*-(-)- α -fenyloglicyny i *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny. Odpowiednie widma masowe, przedstawione na Rys. 57 i 58, różnią się od widm masowych *L*-(+)- α -fenyloglicyny, choć tutaj również wyróżniają się dwa piki przy $m/z=289$ i 301 , które można przypisać dwóm różnym formom dimerycznym α -fenyloglicyny. Proporcje obu pików zmieniają się w zależności od długości przechowywania próbek, podobnie jak przy *L*-(+)- α -fenyloglicynie. W przypadku świeżych roztworów *D*-(-)- α -fenyloglicyny i *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny pik o wartości $m/z=289$ ma mniejszą intensywność względną, niż pik przy $m/z=301$, natomiast dla roztworów przechowywanych przez okres roku sytuacja jest odwrotna. Różnice między widmami poszczególnych roztworów α -fenyloglicyny widoczne są zwłaszcza przy próbkach długo przechowywanych (Rys. 53b, 57b i 58b). *L*-(+)- α -Fenyloglicyna wykazywała znacznie bogatszy zespół sygnałów o wyższych wartościach m/z w widmach rocznego roztworu, niż dla roztworu świeżego (Rys 53a i b). W widma jednorocznych roztworów *D*-(-)- α -fenyloglicyny i *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny nie jest to równie wyraźne, za to zawierają one kilka dobrze wykształconych pików przy wartościach m/z wyższych, niż dla form dimerycznych α -fenyloglicyny, w których monomery są połączone ze sobą wiązaniem wodorowym. W widmie jednorocznej próbki *D*-(-)- α -fenyloglicyny piki takie występują przy $m/z=413$ i 582 (Rys. 57b), natomiast w widmie jednorocznej próbki *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny piki takie występują przy $m/z=369$, 413 i 542 (Rys. 58b). Wartości te mogą pochodzić od określonych fragmentów tetrapeptydu.

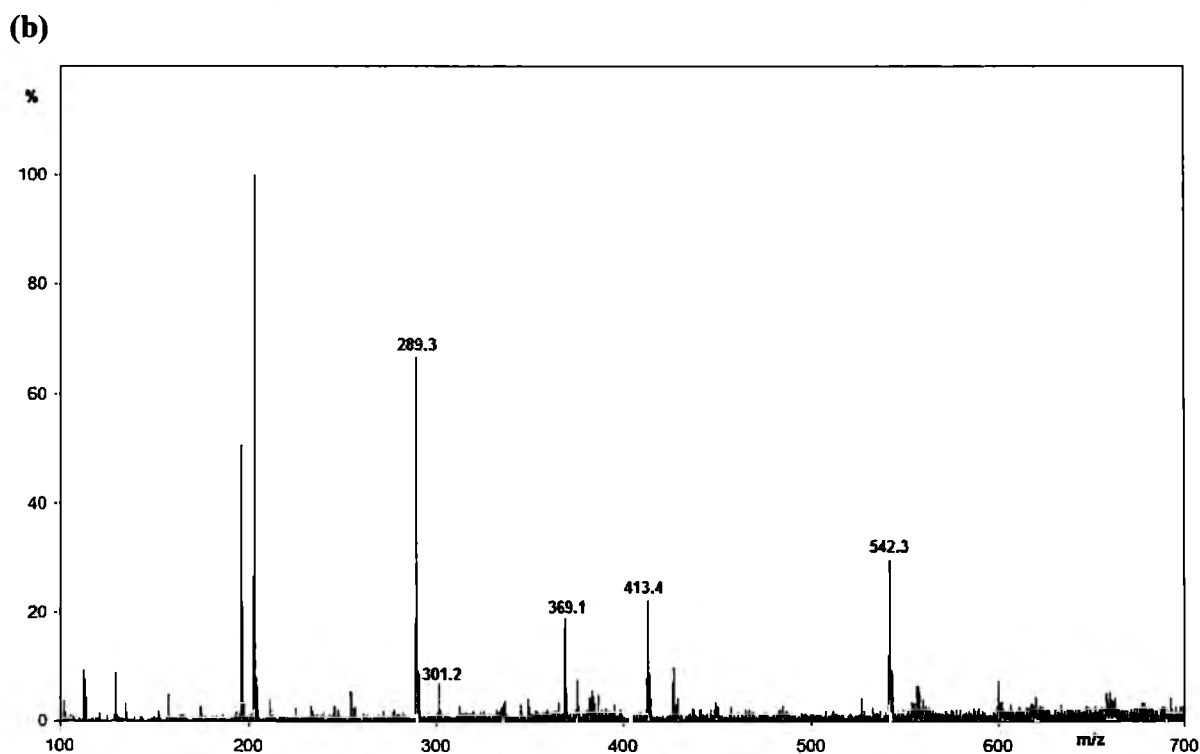
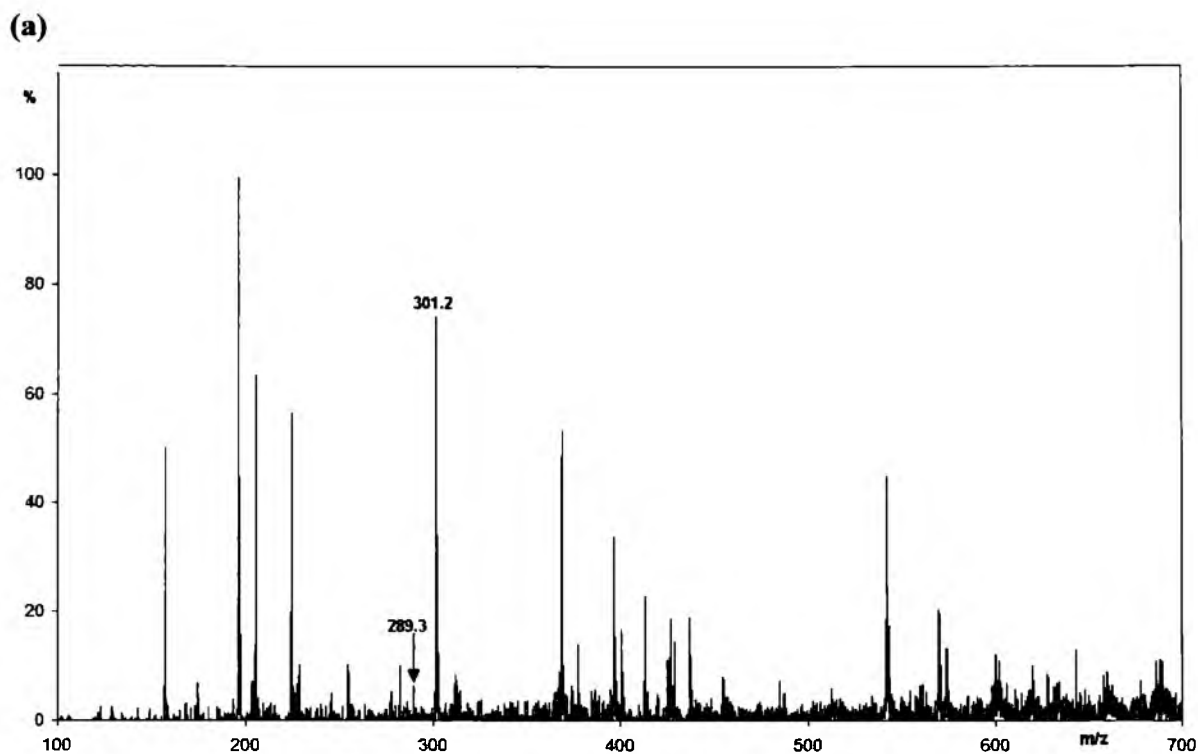
(a)



(b)



Rys. 57. Widma masowe *D*-(-)- α -fenyloglicyny rozpuszczonej w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, zarejestrowane dla (a) świeżej próbki i (b) próbki przechowywanej przez okres jednego roku w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ [234].



Rys. 58. Widma masowe *D,L*-(±)- α -fenyloglicyny rozpuszczonej w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, zarejestrowane dla (a) świeżej próbki i (b) próbki przechowywanej przez okres jednego roku w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ [234].

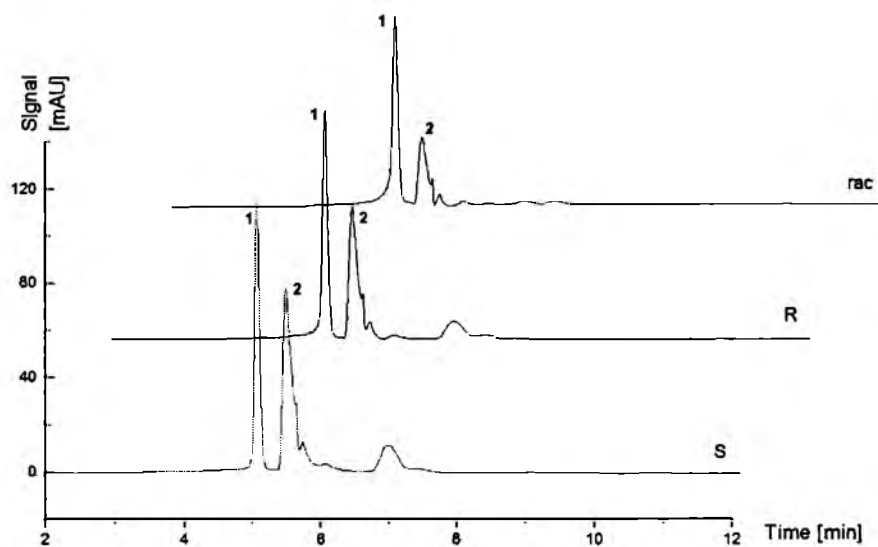
W eksperymencie z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD także śledzono pojawianie się i zmiany stężenia związków chemicznych podczas procesu starzenia się etanolowo-wodnych roztworów *D*-(-)- α -fenyloglicyny i *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny. Ze względu na jakościowe podobieństwo w zachowaniu się obu antymerów oraz racematu α -fenyloglicyny w postaci roztworów etanolowo-wodnych, na Rys. 59 przedstawiono porównanie otrzymanych dla tych związków chromatogramów po 7 dniach i po jednym roku przechowywania próbek. Na wszystkich wykresach widoczne są piki 1 i 2 z czasami retencji odpowiednio 5,2 i 5,4 minuty, w przypadku *D*-(-)- α -fenyloglicyny i *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny prawdopodobnie również odpowiadające dwom różnym formom dimerycznym α -fenyloglicyny.

Jednak bardziej szczegółowa analiza chromatogramów wykazuje ilościowe różnice, wskazujące na nieco odmienną dynamikę starzenia się poszczególnych, badanych roztworów. Jak wynika z Rys. 59a, wysokości pików 1 i 2 oraz ich wzajemne stosunki różnią się dla każdego z roztworów α -fenyloglicyny po 7 dniach ich przechowywania. Wartości wysokości tych pików (oraz wartości ich ilorazów) dla *L*-(+)- α -fenyloglicyny wynoszą odpowiednio 112 i 75 mAV (1,49:1), dla *D*-(-)- α -fenyloglicyny odpowiednio 97 i 54 mAV (1,80:1), oraz dla *DL*-(\pm)- α -fenyloglicyny odpowiednio 89 i 29 mAV (2,79:1). Wynika z tego, iż najmniejsze stężenie form odpowiadających pikom 1 i 2, prawdopodobnie spowodowane największą szybkością peptyzacji, występuje dla *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny. Zgadza się to z wynikiem próby biuretovej i z wynikami pochodzącymi z chromatografii cienkowarstwowej, z których również wynikało, iż w przypadku racematu α -fenyloglicyny peptyzacja równomolowych ilości antymerów zachodzi prawie natychmiastowo.

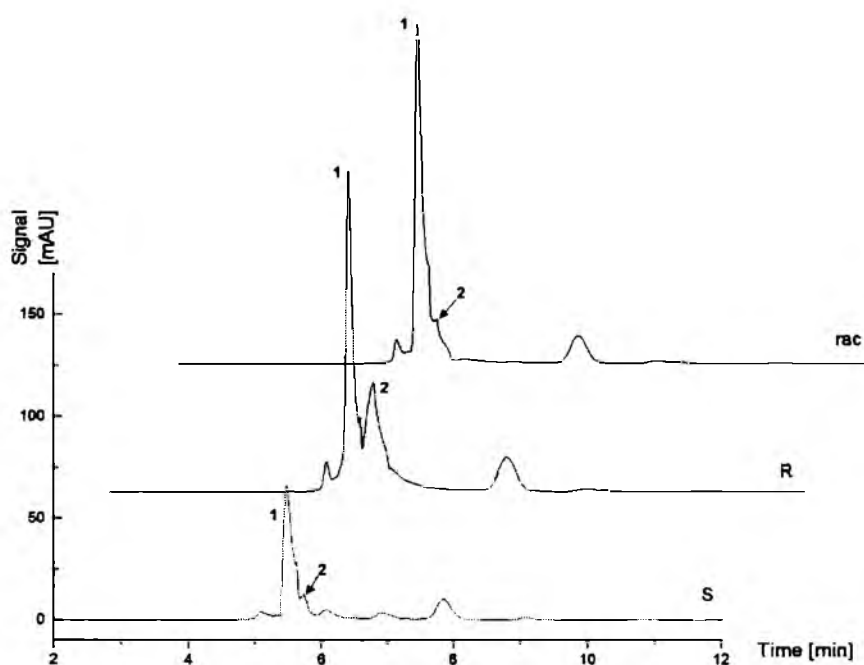
Wartości wysokości pików 1 i 2 (oraz ich wzajemnych stosunków), wyznaczone na podstawie chromatogramów otrzymanych dla jednorocznych roztworów, są następujące: dla *L*-(+)- α -fenyloglicyny odpowiednio 65 i 11 mAV (5,91:1), dla *D*-(-)- α -fenyloglicyny odpowiednio 155 i 50 mAV (3,10:1) oraz dla *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny odpowiednio 169 i 19 mAV (8,63:1). Wyraźnie widać różnice w dynamice procesu peptyzacji dla poszczególnych związków po 7 dniach i po jednym roku przechowywania. Różnice te zostały dodatkowo wyeksponowane na Rys. 60, będącym powiększeniem zakresu od 6 do 12 minut chromatogramów przedstawionych na Rys. 59b. Po roku od sporządzenia poszczególnych roztworów, pojawiają się w nich substancje o wyższych masach cząsteczkowych, będące prawdopodobnie oligopeptydami, uwidocznione na chromatogramach w postaci pików o wysokich czasach retencji, które nie były widoczne po kilku dniach od chwili sporządzenia tych roztworów. Co najistotniejsze, prócz wcześniej wykrytych pików 1-5 (Rys. 54), po roku

starzenia się próbek ujawniają się dodatkowe piki 6-9, dla każdej z próbek z inną intensywnością. Prócz tego w przypadku rocznego roztworu *D*-(-)- α -fenyloglicyny piki 4 i 5 zupełnie zanikają.

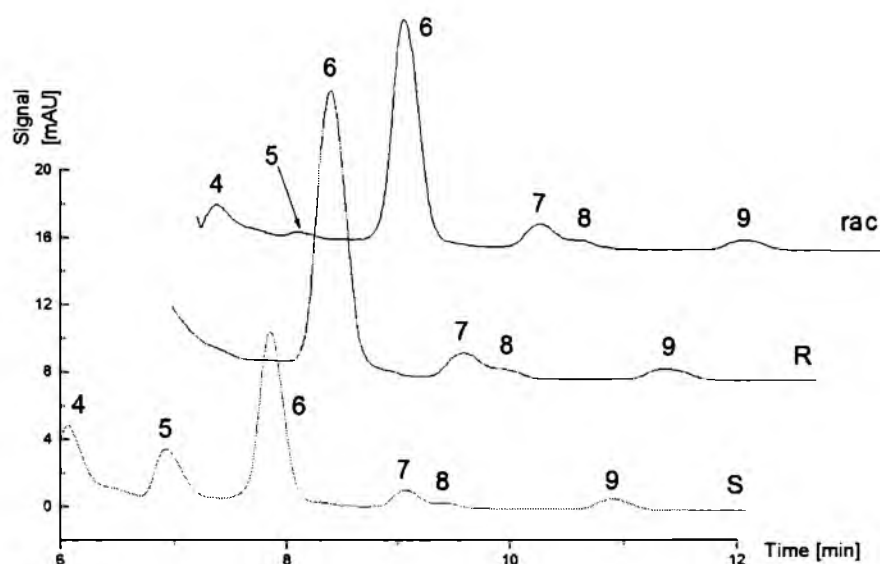
(a)



(b)



Rys. 59. Chromatogramy *L*-(+)- α -fenyloglicyny (S), *D*-(-)- α -fenyloglicyny (R) i *D,L*-(\pm)- α -fenyloglicyny (rac) rozpuszczonych w mieszaninach dwuskładnikowych etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, zarejestrowane przy długości fali 275 nm dla (a) próbek przechowywanych przez okres 7 dni i (b) próbek przechowywanych przez okres jednego roku w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ [234].

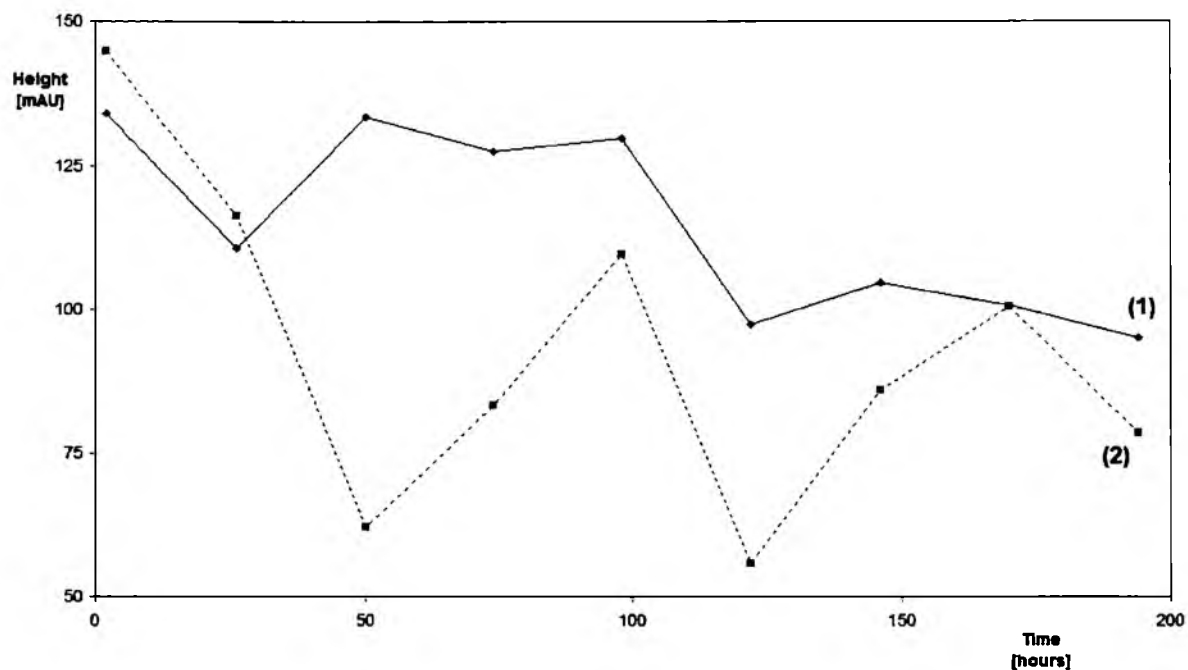


Rys. 60. Chromatogramy *L*-(+)- α -fenyloglicyny (S), *D*-(-)- α -fenyloglicyny (R) i *D,L*(\pm)- α -fenyloglicyny (rac) rozpuszczonych w mieszaninach dwuskładnikowych etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, zarejestrowane przy długości fali 275 nm dla próbek przechowywanych przez okres jednego roku w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ [234].

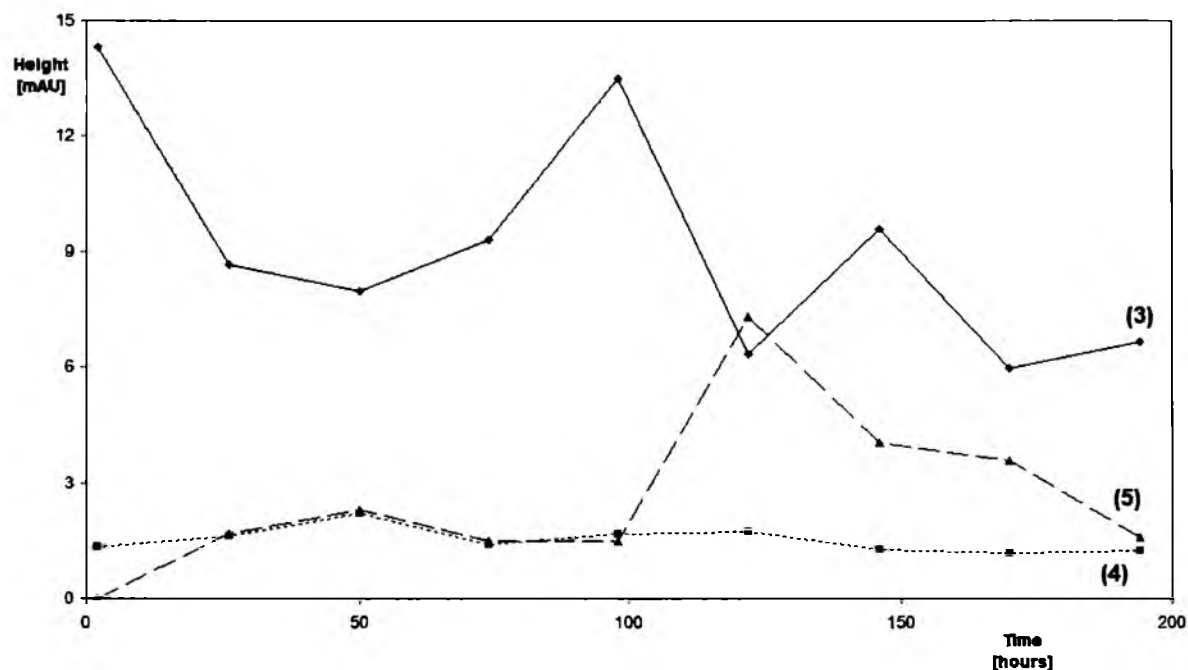
Różnorodność dynamiki starzenia się roztworów *L*-(+)- α -fenyloglicyny i *D*-(-)- α -fenyloglicyny może m.in. wynikać z różnych zawartości zanieczyszczeń w komercyjnych odczynnikach chemicznych (pochodzą one z dwóch różnych procesów produkcyjnych), jak również z tworzenia przez te antymery dwóch różnych form dimerycznych, z których jedna jest bardziej reaktywna w procesie peptyzacji niż druga.

W przypadku *D*-(-)- α -fenyloglicyny i *D,L*(\pm)- α -fenyloglicyny również podjęto próbę określenia, czy wzrost stężenia produktów kondensacji przebiega w sposób monotoniczny, czy też oscylacyjny. W tym celu sporządzono wykresy zmian wysokości poszczególnych pików na chromatogramach rejestrowanych przy długości fali 275 nm dla starzejących się, etanolowo-wodnych roztworów *D*-(-)- α -fenyloglicyny i *D,L*(\pm)- α -fenyloglicyny. Na Rys. 61 i 62 przedstawiono wykresy zmian wysokości pików 1-5 (numery krzywych zgodne z Rys. 54) w zależności od czasu przechowywania poszczególnych roztworów α -fenyloglicyny. Również w tych przypadkach wyraźnie widać, iż wysokości pików zmieniają się w sposób niemonotoniczny, jednak dość długi czas między poszczególnymi pomiarami uniemożliwia bliższe określenie częstotliwości oscylacyjnych zmian wysokości obserwowanych pików.

(a)

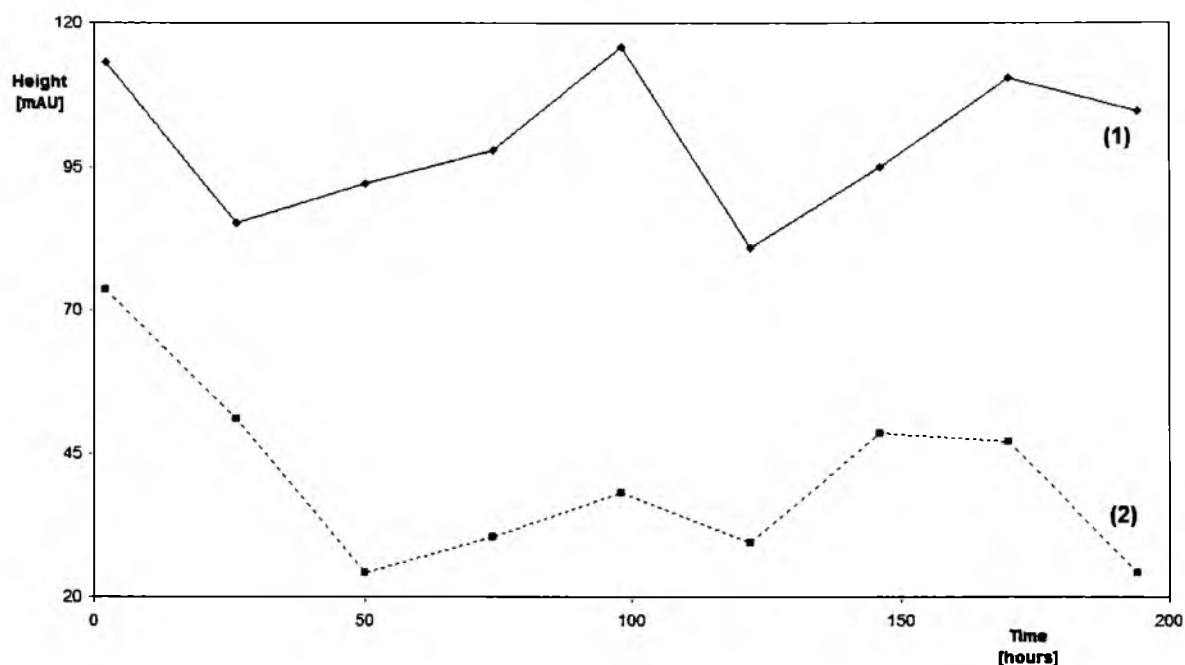


(b)

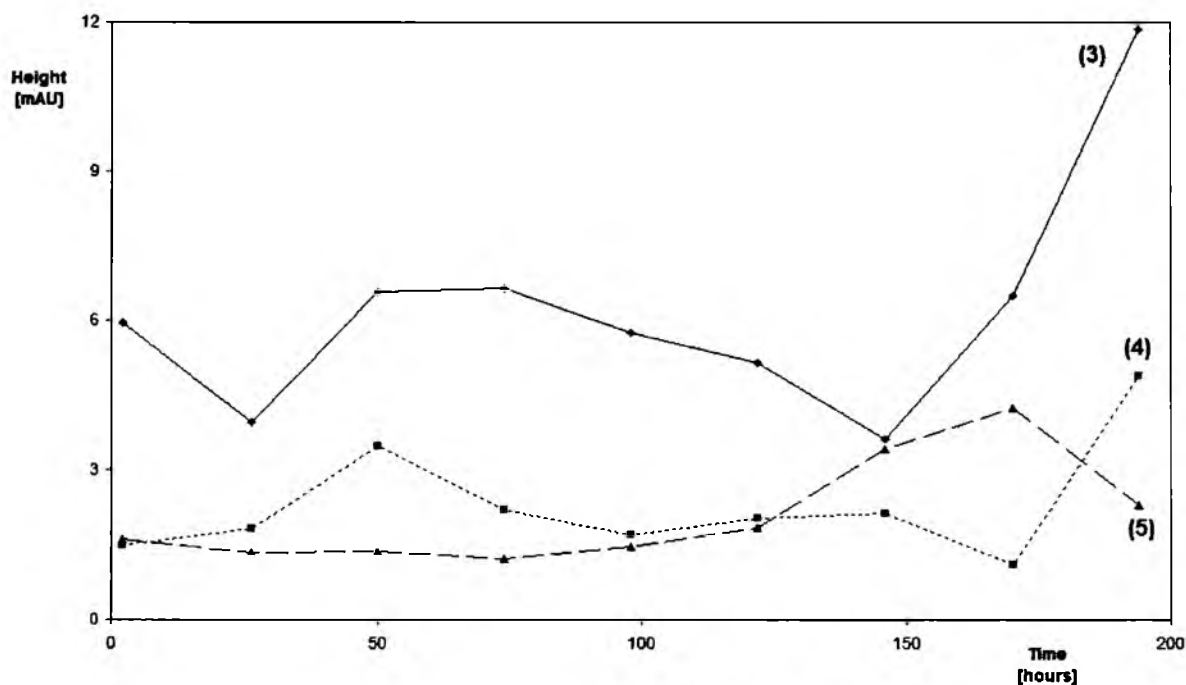


Rys. 61. Zmiany wysokości pików chromatograficznych dla *D*-(-)- α -fenyloglicyny rozpuszczonej w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3 przechowywanej przez okres 9 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. (a) Krzywe zmian dla pików 1 ($t_R=5,2$ min) i 2 ($t_R=5,4$ min) oraz (b) krzywe zmian dla pików 3 ($t_R=5,6$ min), 4 ($t_R=6,0$ min) i 5 ($t_R=6,9$ min) odpowiadają analogicznie numerowanym pikom chromatograficznym na Rys. 54 [234].

(a)

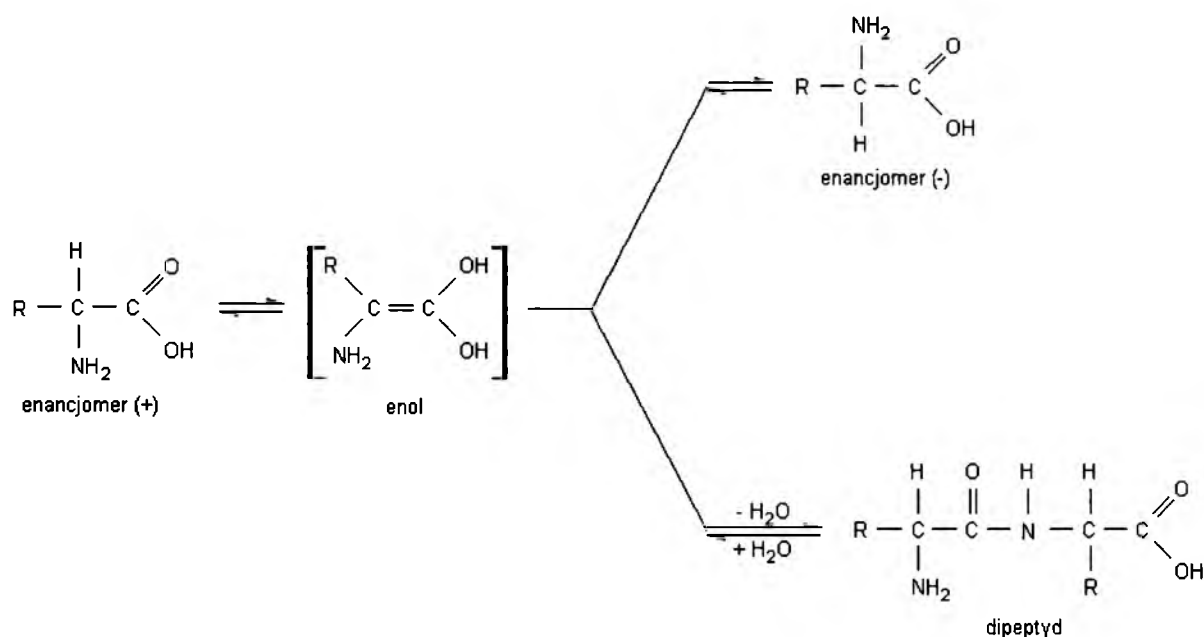


(b)



Rys. 62. Zmiany wysokości pików chromatograficznych dla *D,L*-(±)- α -fenyloglicyny rozpuszczonej w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3 przechowywanej przez okres 9 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. (a) Krzywe zmian dla pików 1 ($t_R=5,2$ min) i 2 ($t_R=5,4$ min) oraz (b) krzywe zmian dla pików 3 ($t_R=5,6$ min), 4 ($t_R=6,0$ min) i 5 ($t_R=6,9$ min) odpowiadają analogicznie numerowanym pikom chromatograficznym na Rys. 54 [234].

Przedstawione tutaj wyniki eksperymentu przemawiają za tym (podobnie jak te otrzymane przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej i próby biurekowej), iż α -fenyloglicyna w formie optycznie czystej czy też racemicznej, obok inwersji chiralnej może ulegać polikondensacji, co w rezultacie prowadzi do powstawania dipetydów, tripeptydów, a nawet wyższych oligopeptydów. Oba te procesy są ze sobą sprzężone, zachodząc w sposób niemonotoniczny, a nawet oscylacyjny. Najbardziej prawdopodobny mechanizm procesu chiralnej inwersji aminokwasów prowadzi poprzez produkt pośredni – enol. Proces chiralnej inwersji można traktować jako równoległy do procesu polikondensacji, co w uproszczony sposób ilustruje Rys. 63.

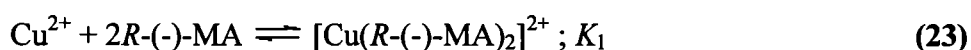


Rys. 63. Ogólne przedstawienie procesu samorzutnej inwersji chiralnej oraz samorzutnej peptyzacji aminokwasu, przebiegających w sposób równoległy (R to podstawnik aryłowy lub alkilowy).

7.4.3. Oscylacyjna inwersja chiralna i oscylacyjna polikondensacja kwasu migdałowego *in vitro* w środowisku wodnym

7.4.3.1. Achiralna chromatografia cienkowarstwowa

Celem niniejszych badań było eksperymentalne stwierdzenie, czy kwas *S*-(+)-migdałowy oraz kwas *R*-(-)-migdałowy ulegają inwersji chiralnej, czyli przemianie enancjomeru *S*-(+) w *R*-(-) i odwrotnie. Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literaturowego i według naszej najlepszej wiedzy, wyniki prezentowane w tym rozdziale są pierwszą próbą rozdzielania enancjomerów kwasu migdałowego przy pomocy achiralnej chromatografii cienkowarstwowej. Warunki rozdziału dla układu TLC zostały częściowo zaczerpnięte z publikacji Cecchiego i Malaspiny [224], którzy jako pierwsi i do tej pory jedyni opracowali warunki rozdziału antymerów kwasu mlekowego techniką chromatografii cienkowarstwowej. W niniejszej pracy jako fazę stacjonarną wykorzystano gotowe płytki chromatograficzne pokryte żelom krzemionkowym i zaimpregnowane roztworem zawierającym jony Cu^{2+} . Faza ruchoma składała się z dioksanu i wody (9:1, v/v). W tym przypadku proces retencji enancjomerów hydroksykwasu był oparty na mechanizmie kompleksowania, schematycznie przedstawionym poniższymi równaniami:



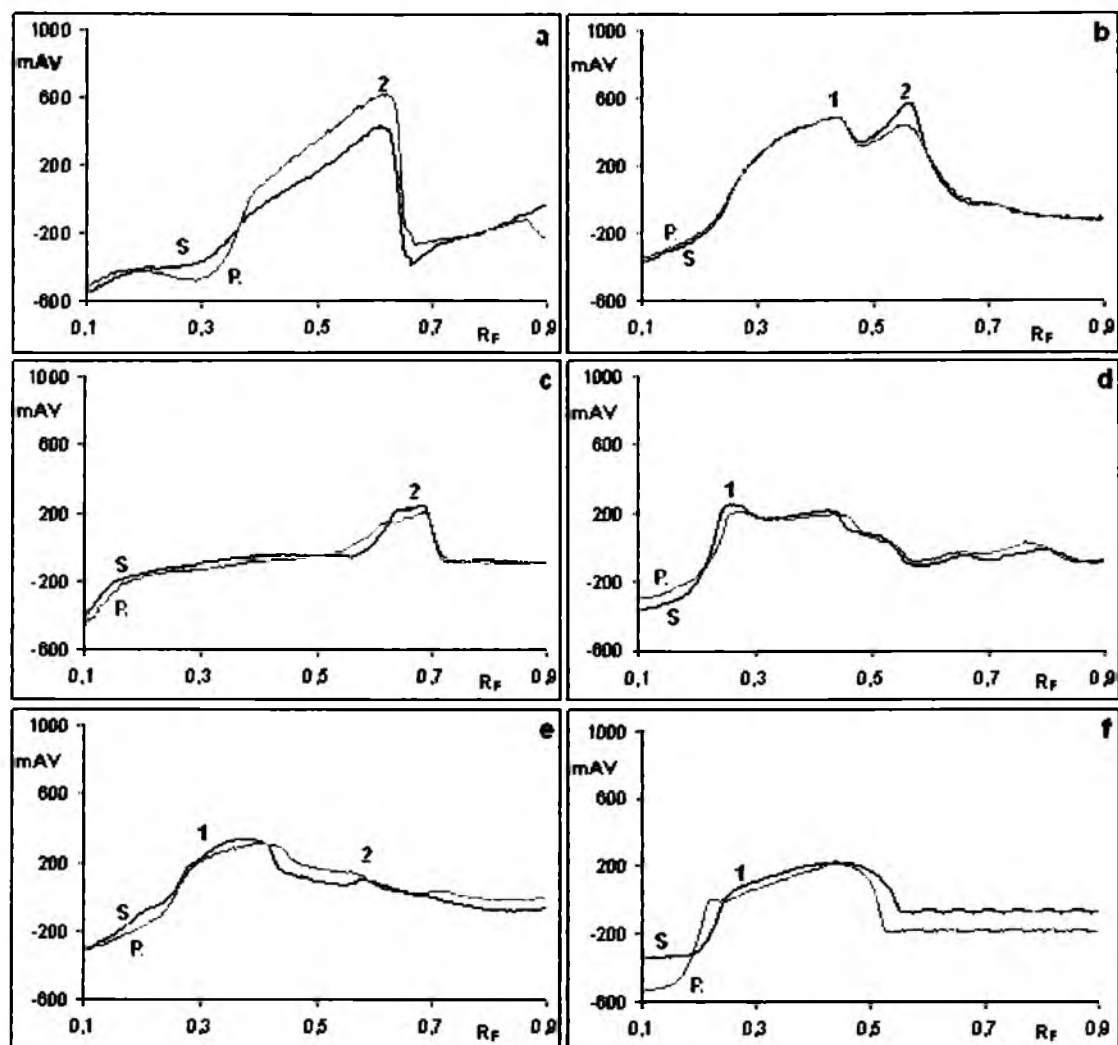
gdzie MA to kwas migdałowy, K_1 i K_2 przedstawiają stałe równowagi odpowiednich reakcji chelatowania, natomiast nierówność $K_1 \neq K_2$ jest podstawowym warunkiem rozdziału chromatograficznego dwu antymerów kwasu migdałowego.

Rozwijanie chromatogramów prowadzono w wariacie jednokierunkowym i dwukierunkowym w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Do badań użyto roztworów etanolowo-wodnych (7:3, v/v) czystych enancjomerów oraz racematu kwasu migdałowego, sporządzonego przez zmieszanie optycznie czystych antymerów *S*-(+) i *R*-(-) w stosunku molowym 1:1. System jednokierunkowy był stosowany codziennie przez okres 12 dni od sporządzenia roztworów poszczególnych antymerów (z wyłączeniem dnia 5 i 6). System dwukierunkowy został zastosowany po 12 dniach przechowywania czystych enancjomerów i po 2 dniach przechowywania roztworu racematu.

Empiryczny dowód na to, iż enancjomery kwasu migdałowego ulegają szybkiej oscylacyjnej inwersji chiralnej został zaprezentowany na Rys. 64, przedstawiającym profile stężeniowe dla chromatogramów roztworów obu antymerów zdensytometrowanych po 0, 2, 4, 7, 9 i 11 dniach przechowywania w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Densytogramy te pokazują, że w odpowiednich dniach profile stężeniowe obu antymerów są bardzo zbliżone swoim wyglądem, przy jednoczesnej dużej zmienności tych profili, rozpatrując je dla różnych dni eksperymentu. Zatem zastosowany system jednokierunkowy tylko czasami pozwala na częściowe rozróżnienie enancjomerów (Rys. 64b i e). Ponadto fakt ten uniemożliwia nam rozróżnienie, który profil należy do danego enancjomeru (kwasu *S*-(+)-migdałowego, czy też kwasu *R*-(-)-migdałowego). W takim razie nie da się jednoznacznie przypisać enancjomerów do odpowiednich profili stężeniowych na kolejnych rysunkach.

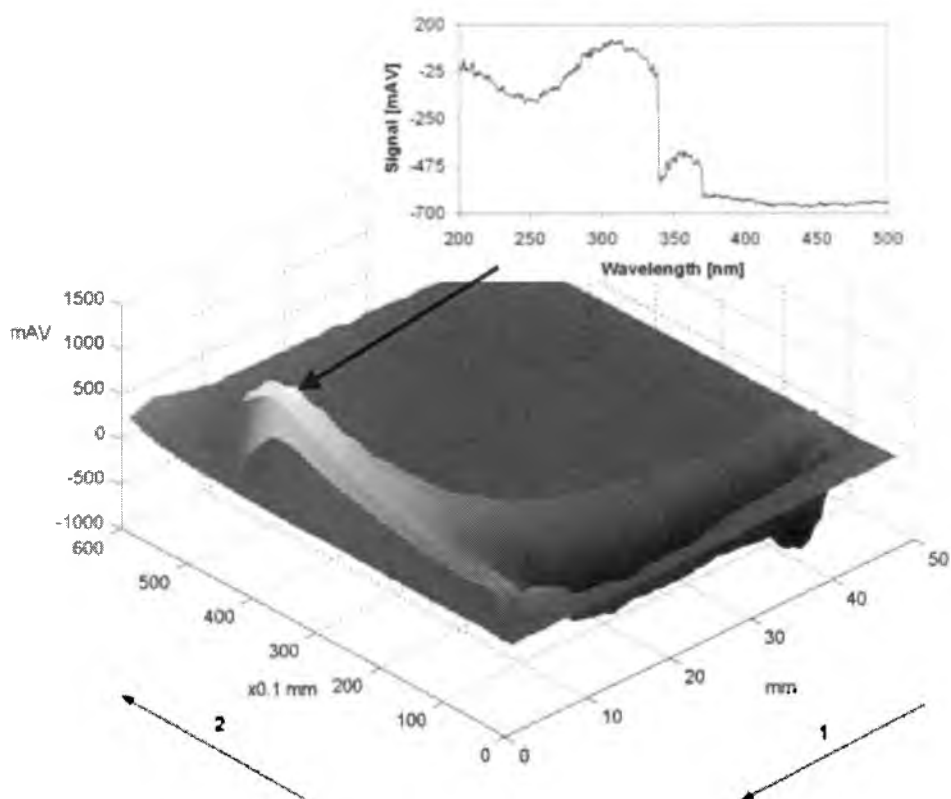
Omawiane profile stężeniowe mają nie tylko zmienny kształt, ale także zmienne położenie na skali R_F . Maksimum profilu stężeniowego, oznaczonego na Rys. 64 jako 1, osiąga skrajną dolną wartość współczynnika retardacji równą 0,25 (Rys. 64d), natomiast maksimum oznaczone jako 2, występuje przy skrajnej górnej wartości R_F , równej 0,66 (Rys. 64c). Ta sytuacja jeszcze bardziej dowodzi, że zastosowany układ chromatograficzny nie jest źle dobrany, a jedynie labilność steryczna antymerów kwasu migdałowego jest tak duża, że ich rozdział nie zawsze jest możliwy.

Różnice w kształcie profili stężeniowych oraz w ich położeniach na skali R_F wynikają z chiralnej labilności badanych związków oraz ze stale zachodzącej oscylacyjnej inwersji chiralnej, jednak nie wiadomo, czy ma ona swoje źródło w zastosowanym rozpuszczalniku etanolowo-wodnym i czasie przechowywania obu antymerów, czy też w międzycząsteczkowych oddziaływaniach między kwasem migdałowym a składnikami układu chromatograficznego, czy może wynika ona z połączonego wpływu wszystkich tych czynników.

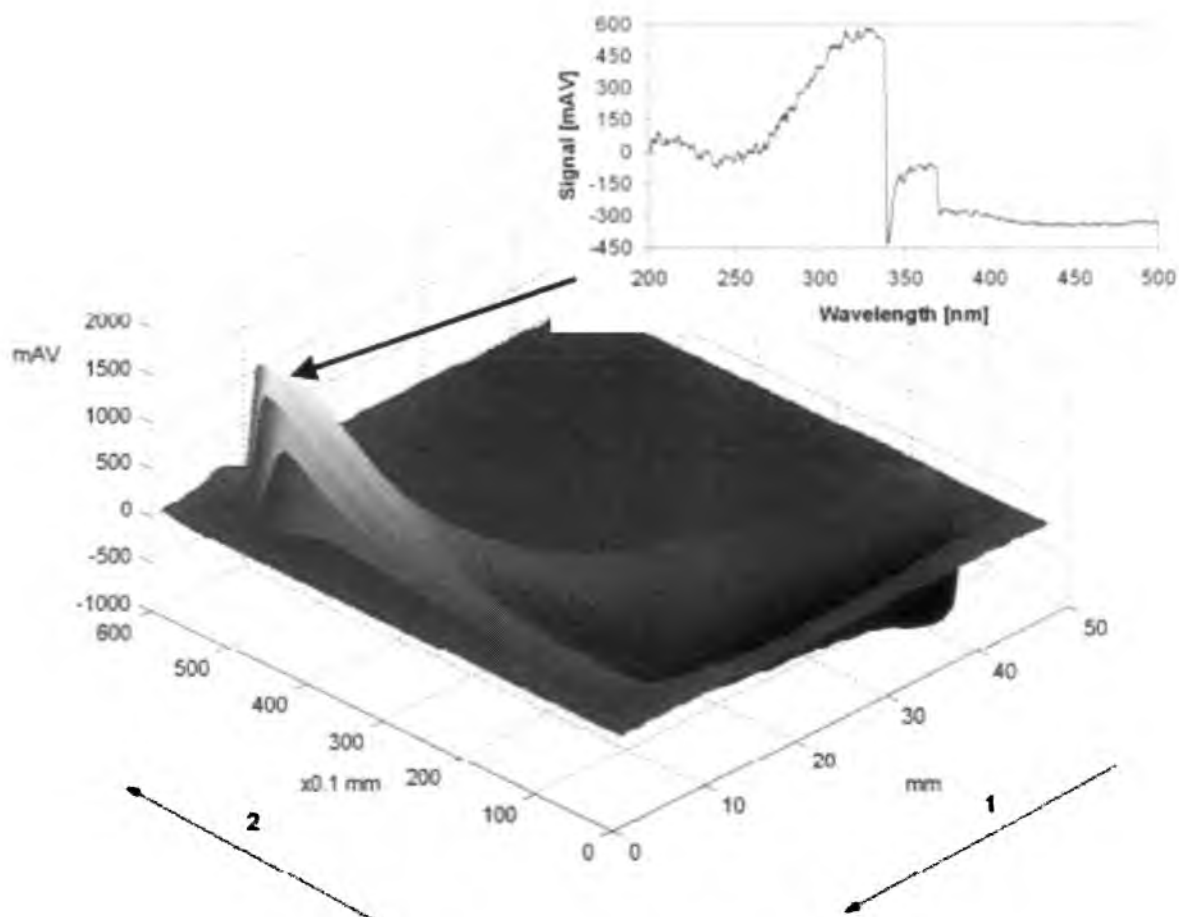


Rys. 64. Ekstremalne pozycje maksimów profili stężeniowych dla roztworu kwasu *S*-(+)-migdałowego w etanolu z wodą (7:3, v/v) oraz dla roztworu kwasu *R*-(-)-migdałowego w etanolu z wodą (7:3, v/v), zdensytometrowanych po (a) 0, (b) 2, (c) 4, (d) 7, (e) 9, oraz (f) 11 dniach przechowywania [235].

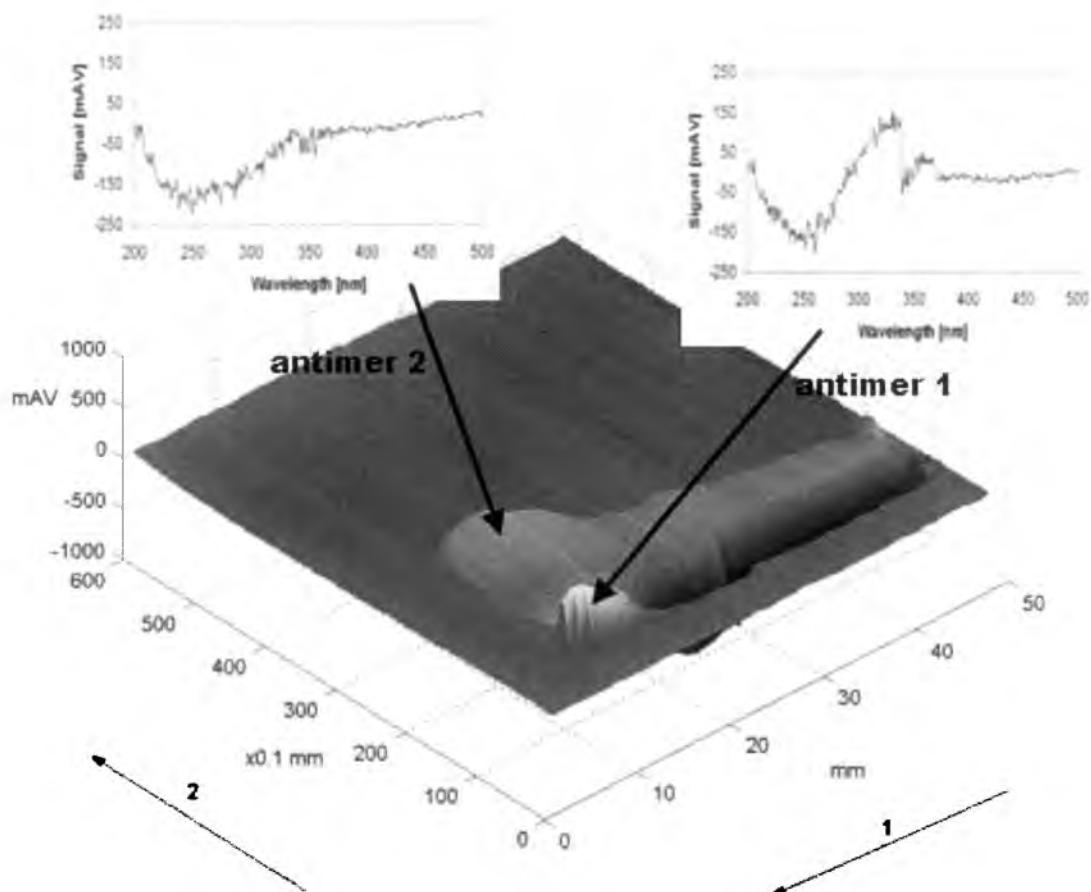
Podjęto zatem próby rozdzielenia enancjomerów kwasu migdałowego w układzie dwukierunkowym. Na Rys. 65, 66 i 67 przedstawiono trójwymiarowe densytogramy przedstawiające rozdział antymerów kwasu migdałowego. Kwas *S*-(+)-migdałowy i kwas *R*-(-)-migdałowy prawdopodobnie ulegają tak szybkiej inwersji chiralnej, a oddziaływania boczne *S*...*R* są przy tym tak efektywne, że nawet w układzie dwukierunkowym w żadnym z tych przypadków nie udało się dokonać zadowalającego rozdzielenia (Rys. 65 i 66). Udało się to osiągnąć dopiero w przypadku etanolowo-wodnego roztworu racematu kwasu migdałowego (Rys. 67), kiedy to oba antymery występowały w molowych proporcjach 1:1. Dowodzi to, że w dwukierunkowym układzie chromatograficznym i przy zbliżonych ilościach obu antymerów rozdział jest jednak możliwy. Niestety, nie da się określić, który z pików pochodzi od którego enancjomeru. Na Rys. 67 widoczne są również widma UV. Wskazują one, iż antymeru o niższej wartości współczynnika retardacji R_F jest wyraźnie więcej, niestety, tak jak wcześniej wspomniano, nie wiadomo, który konkretnie jest to enancjomer.



Rys. 65. Trójwymiarowy densytogram przedstawiający rozdział enancjomerów kwasu migdałowego uzyskany po dwukierunkowym rozwinięciu próbki roztworu kwasu *S*-(+)-migdałowego w mieszaninie etanol + woda (7:3, v/v) przechowywanego przez 12 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Densytogram wygenerowano na podstawie wyników otrzymanych przez skanowanie odpowiednich chromatogramów 30 równoległymi liniami w odstępach 1 mm [235].



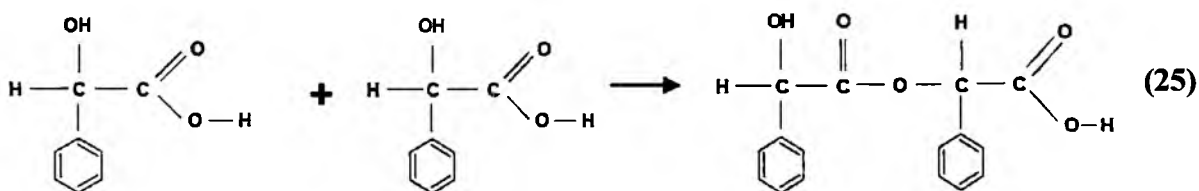
Rys. 66. Trójwymiarowy densytogram przedstawiający rozdział enancjomerów kwasu migdałowego uzyskany po dwukierunkowym rozwinięciu próbki roztworu kwasu *R*-(-)-migdałowego w mieszaninie etanol + woda (7:3, v/v) przechowywanego przez 12 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Densytogram wygenerowano na podstawie wyników otrzymanych przez skanowanie odpowiednich chromatogramów 30 równoległymi liniami w odstępach 1 mm [235].



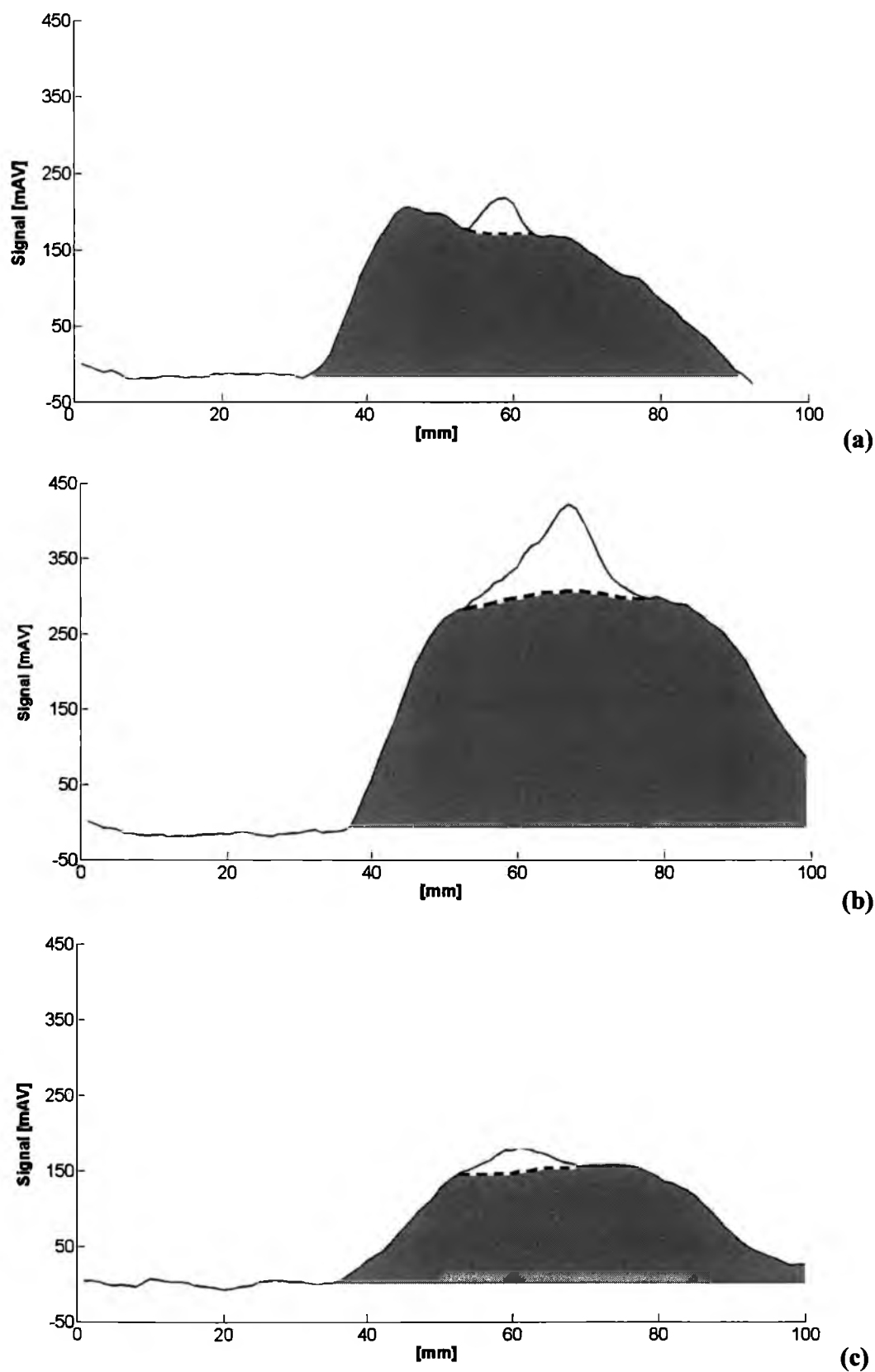
Rys. 67. Trójwymiarowy densytogram przedstawiający rozdział enancjomerów kwasu migdałowego uzyskany po dwukierunkowym rozwinięciu próbki roztworu kwasu *S,R*(±)-migdałowego w mieszaninie etanol + woda (7:3, v/v) przechowywanego przez 2 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Densytogram wygenerowano na podstawie wyników otrzymanych przez skanowanie odpowiednich chromatogramów 30 równoległymi liniami w odstępach 1 mm [235].

Sama chromatografia cienkowarstwowa nie wyjaśnia, czy źródłem inwersji chiralnej antymerów kwasu migdałowego jest zastosowany rozpuszczalnik etanolowo-wodny, czy też międzycząsteczkowe oddziaływania między kwasem migdałowym a składnikami układu chromatograficznego, a może wynika ona z kombinacji tych czynników. Uzyskane wyniki jedynie dowodzą, iż proces inwersji chiralnej w przypadku kwasu migdałowego zachodzi. W ten sposób zostało pokazane, że związkiem ulegającym konwersji niekoniecznie musi być tylko profen jako związek pochodny kwasu propionowego (jak np. wcześniej opisany flurbiprofen), czy też aminokwas (jak np. wcześniej opisana α -fenyloglicyna). Okazuje się, że związkiem takim może być również chiralny hydroksykwas, będący pochodną kwasu octowego.

Wcześniejsze stwierdzenie, iż α -fenyloglicyna może samorzutnie ulegać peptyzacji było inspiracją do podjęcia kolejnego kroku badawczego, a mianowicie do sprawdzenia, czy kwas migdałowy może również ulegać analogicznemu procesowi kondensacji. Istotnym argumentem za podjęciem takiego kroku był fakt, iż antymery kwasu migdałowego ulegają samorzutnej oscylacyjnej inwersji chiralnej zupełnie tak samo, jak enancjomery α -fenyloglicyny. Analogicznie do eksperymentu TLC prowadzonego z α -fenyloglicyną, antymer *S*-(+) oraz racemat kwasu migdałowego rozpuszczono w czystej wodzie, w mieszaninie etanol-woda (7:3, v/v) i w czystym etanolu. Tak przygotowane roztwory po 2 dniach przechowywania były chromatografowane w układzie jednokierunkowym. Na Rys. 68 przedstawiono profile stężeniowe otrzymane dla kwasu *R,S*-(\pm)-migdałowego (wyniki dla kwasu *S*-(+)-migdałowego były w pełni analogiczne). W profilach tych można wyróżnić szeroki obszar podwyższonej absorpcji, który można przypisać polikondensatom kwasu migdałowego o różnym stopniu skondensowania. Obszary te na Rys. 68 zaznaczono poprzez zaciemnienie. Prosty przedstawieniem procesu kondensacji może być poniższy schemat, ilustrujący powstawanie dikwasu migdałowego [236], analogicznie do powstawania dipeptydu na schemacie (18):



Prawdopodobnie proces kondensacji kwasu migdałowego ma związek z jego oscylacyjną inwersją chiralną, podczas której dochodzi do powstania enolu (Rys. 7 i 8). Za tym, że obecność enolu wpływa na przebieg procesu kondensacji przemawiają rezultaty widoczne na krzywych przedstawionych na Rys. 68. Wynika z nich, że najlepsze warunki dla kondensacji daje mieszanina etanol-woda. Czysta woda mniej sprzyja procesowi kondensacji, gdyż cząsteczki wody powstają jako produkt kondensacji, więc zgodnie z regułą przekory Le Châteliera woda zastosowana jako rozpuszczalnik przesuwą równowagę procesu kondensacji w kierunku substratów. Najmniej sprzyjający jako rozpuszczalnik jest czysty etanol, ponieważ mechanizm procesu kondensacji zawiera etap, podczas którego dochodzi do heterolitycznego rozpadu określonych wiązań, co jednak obecność wody w pewien istotny sposób ułatwia.

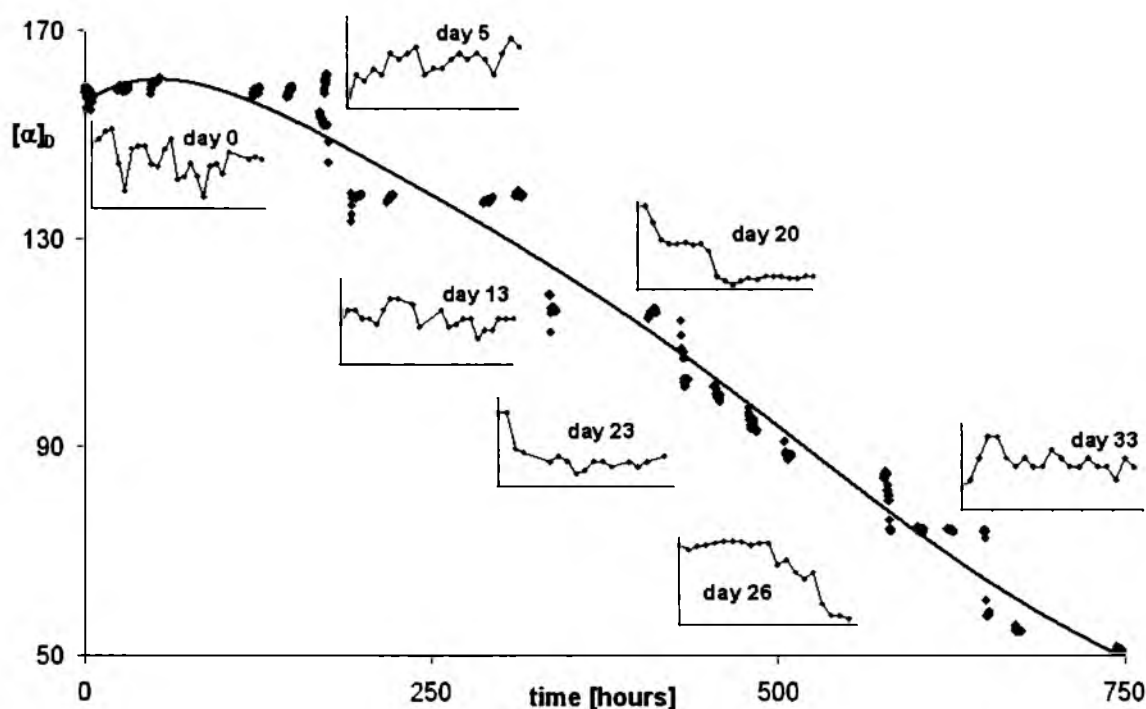


Rys. 68. Porównanie profili stężeniowych pozostałości na początku chromatogramów otrzymanych dla kwasu *R,S*-(±)-migdałowego przechowywanego przez 2 dni w (a) wodzie, (b) mieszaninie etanol-woda (7:3, v/v) oraz (c) etanolu [236].

7.4.3.2. Polarymetria

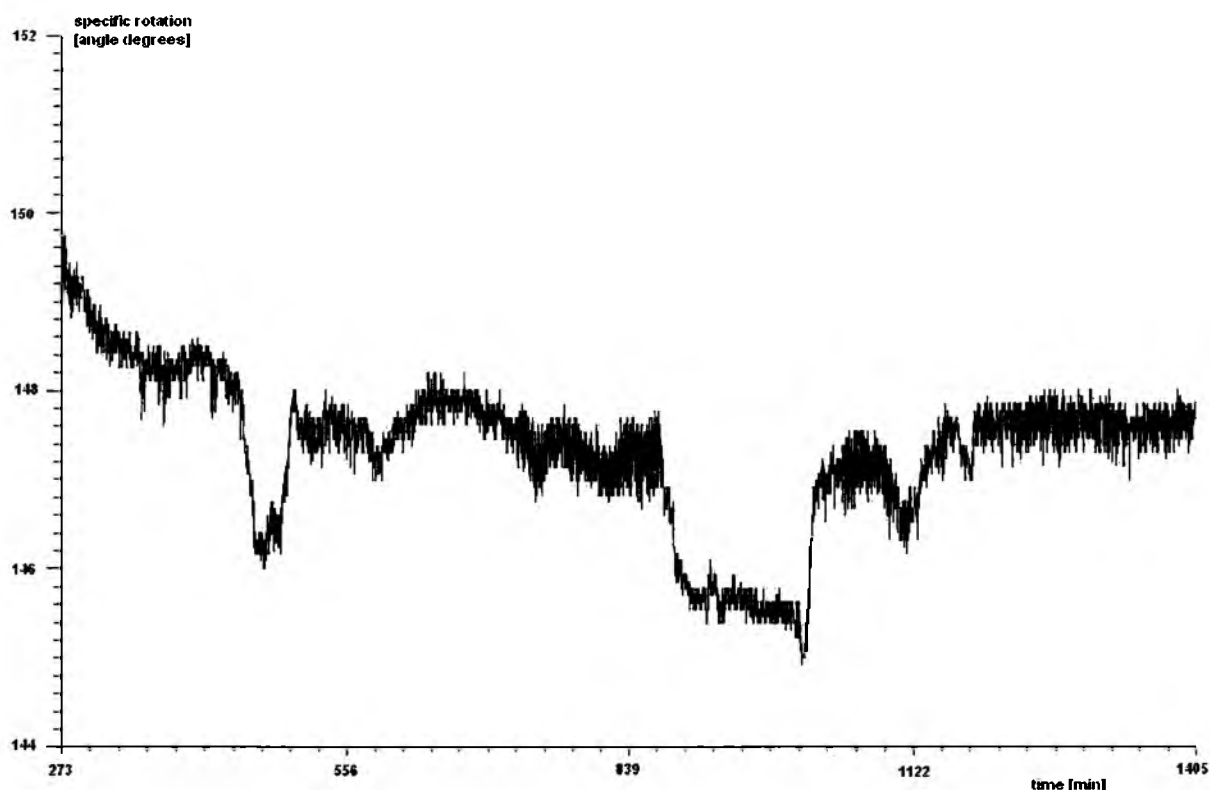
Pomiary zmian skręcalności właściwej kwasu *S*-(+)-migdałowego zostały przeprowadzone w trzech niezależnych doświadczeniach.

W pierwszym doświadczeniu zmiany skręcalności właściwej kwasu *S*-(+)-migdałowego w roztworze etanolowo-wodnym, przechowywanym przez 34 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$, były rejestrowane w sposób nieciągły niemal codziennie, po kilka godzin dziennie w 15-minutowych odstępach czasu. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rys. 69. Na rysunku tym widać, iż zmiany skręcalności właściwej kwasu *S*-(+)-migdałowego są z natury oscylacyjne, co zostało dobitnie pokazane w „okienkach” zamieszczonych na tym rysunku, a długoterminowy trend zmian wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ wskazuje na postępujący proces racemizacji kwasu *S*-(+)-migdałowego (wartości $[\alpha]_D$ zmierzają do zera).



Rys. 69. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla kwasu *S*-(+)-migdałowego rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Główny kierunek zmian jest zaznaczony linią ciągłą, a wykresy w „okienkach” obrazują zmiany zachodzące w wybranych dniach prowadzenia eksperymentu [235].

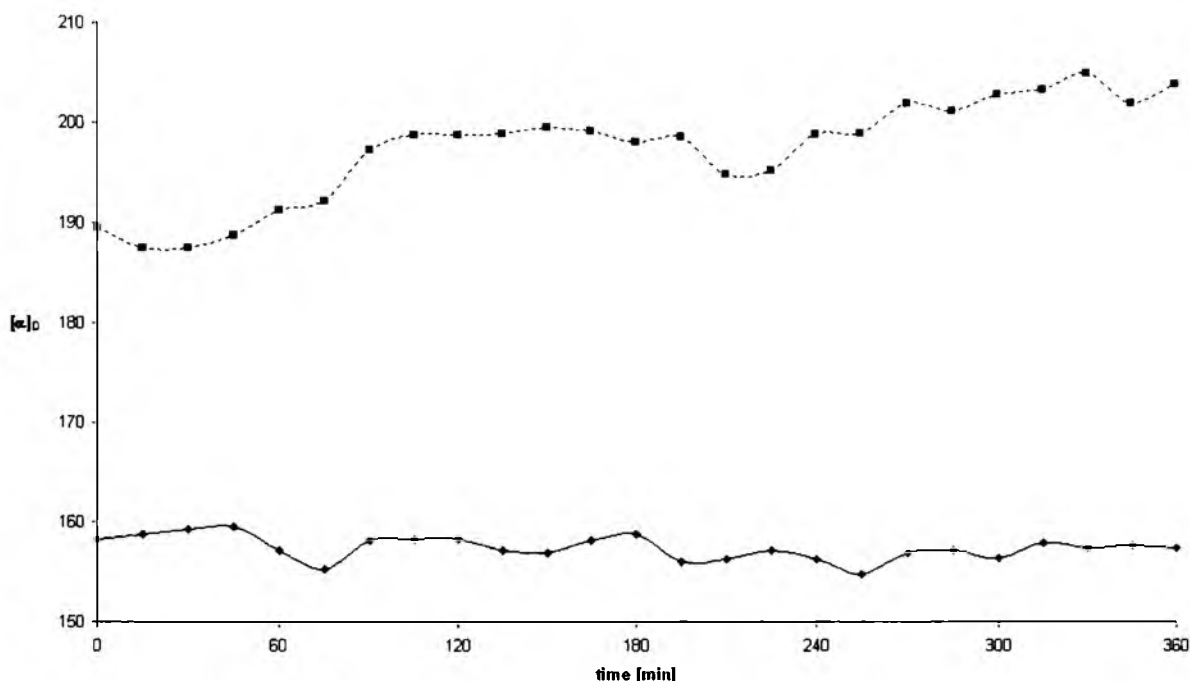
W drugim eksperymencie polarymetrycznym rejestrację oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej przeprowadzono w sposób ciągły, również w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ przez pierwsze 24 godziny od chwili sporządzenia roztworu kwasu *S*-(+)-migdałowego w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym. Uzyskany wynik przedstawiono na Rys. 70.



Rys. 70. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla kwasu *S*-(+)-migdałowego rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ [236].

Wynik ciągłej rejestracji zmian skręcalności właściwej roztworu kwasu *S*-(+)-migdałowego w funkcji czasu stanowi kolejny dowód na to, iż obserwowane zmiany mają charakter oscylacyjny. Można zatem stwierdzić, iż kwas *S*-(+)-migdałowy ulega dynamicznej inwersji chiralnej w roztworze etanolowo-wodnym.

W trzecim doświadczeniu skręcalność właściwa $[\alpha]_D$ roztworów kwasu *S*-(+)-migdałowego była mierzona w sposób nieciągły przez okres 6 godzin w dwóch temperaturach: $9\pm 1^{\circ}\text{C}$ i $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. W żadnym z tych dwóch przypadków skręcalność właściwa nie pozostawała niezmienna w czasie. Przeciwnie, obserwowano oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej podczas trwania całego eksperymentu. Amplituda tych zmian była jednakże mniejsza w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, niż w temperaturze $9\pm 1^{\circ}\text{C}$. Na Rys. 71 przedstawiono wyniki uzyskane w trzecim doświadczeniu.



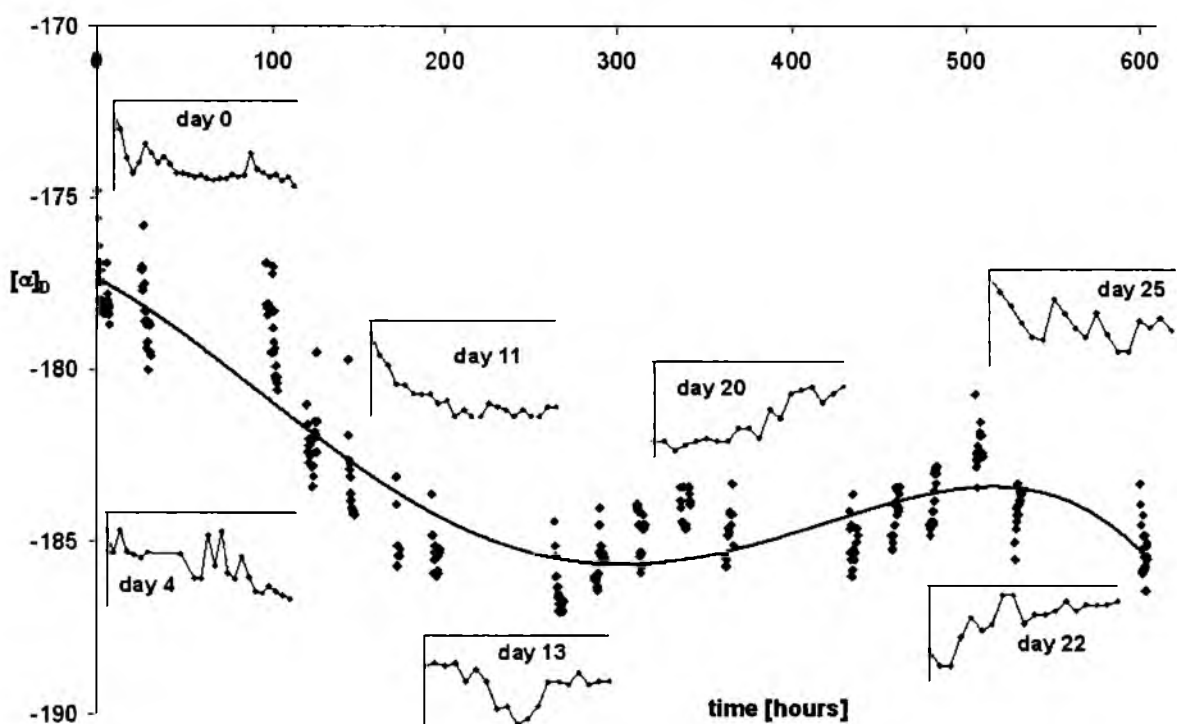
Rys. 71. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla kwasu *S*-(+)-migdałowego rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3 przechowywanego w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$ (linia ciągła) i $9\pm 1^\circ\text{C}$ (linia przerywana) [235].

Rejestracja zmian skręcalności właściwej w trzecim z przeprowadzonych eksperymentów polarymetrycznych miała na celu wyeksponowanie wpływu czynnika dyfuzyjnego na przebieg obserwowanego procesu, najprawdopodobniej będącego samorzutną, oscylacyjną inwersją chiralną kwasu *S*-(+)-migdałowego. Wpływ czynnika dyfuzyjnego starano się wyeksponować poprzez obniżenie temperatury badanego roztworu, co powodowało wzrost jego lepkości. Silny wzrost amplitudy oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ badanych roztworów, wywołany obniżeniem ich temperatury i jednoczesnym wzrostem ich lepkości wskazuje na bardzo istotną rolę dyfuzji w badanym procesie, jak to ma bardzo często miejsce w przypadku różnych reakcji oscylacyjnych.

Wyniki badań polarymetrycznych oraz badań przeprowadzonych techniką achiralnej chromatografii cienkowarstwowej wyraźnie wskazują na to, iż kwas *S*-(+)-migdałowy łatwo może ulegać oscylacyjnej inwersji chiralnej, po uprzednim rozpuszczeniu w zawierającym wodę rozpuszczalniku niskocząsteczkowym.

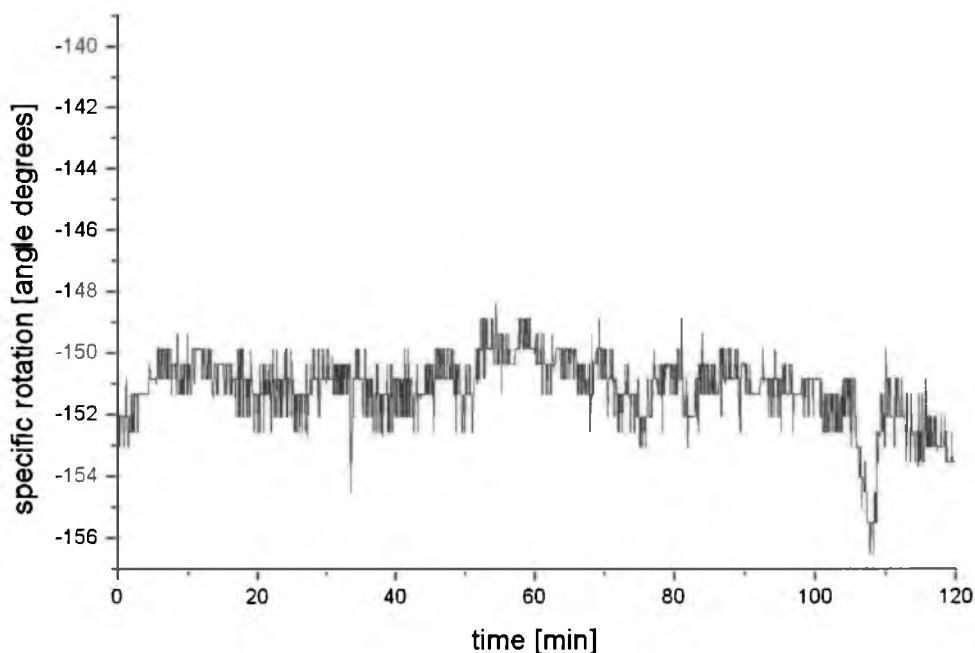
Badania zmian skręcalności właściwej kwasu *R*-(-)-migdałowego były przeprowadzone, analogicznie, jak w przypadku jego antymeru *S*-(+), w trzech kolejnych doświadczeniach.

W pierwszym doświadczeniu zmiany skręcalności właściwej kwasu *R*-(-)-migdałowego w roztworze etanolowo-wodnym, przechowywanym przez okres 26 dni w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, były rejestrowane w sposób nieciągły niemal codziennie, po kilka godzin dziennie w 15-minutowych odstępach czasu. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rys. 72. Pokazuje on, iż zmiany skręcalności właściwej kwasu *R*-(-)-migdałowego są z natury oscylacyjne, natomiast, w przeciwieństwie do kwasu *S*-(+)-migdałowego, długoterminowy trend zmian wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ nie wskazuje na postępujący proces racemizacji (wartości $[\alpha]_D$ nie zmierzają do zera). Może to np. wynikać z jakościowych i ilościowych różnic w zawartościach poszczególnych antymerów śladowych zmięczyń (gdyż oba enancjomery kwasu migdałowego pochodzą z dwóch różnych procesów produkcyjnych).



Rys. 72. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla kwasu *R*-(-)-migdałowego rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Główny kierunek zmian jest zaznaczony linią ciągłą, a wykresy w „okienkach” obrazują zmiany zachodzące w wybranych dniach prowadzenia eksperymentu [235].

W drugim eksperymencie polarymetrycznym rejestrację oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej przeprowadzono w sposób ciągły, również w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ przez pierwsze 2 godziny od chwili sporządzenia roztworu kwasu *R*-(-)-migdałowego w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym. Uzyskany wynik przedstawiono na Rys. 73.

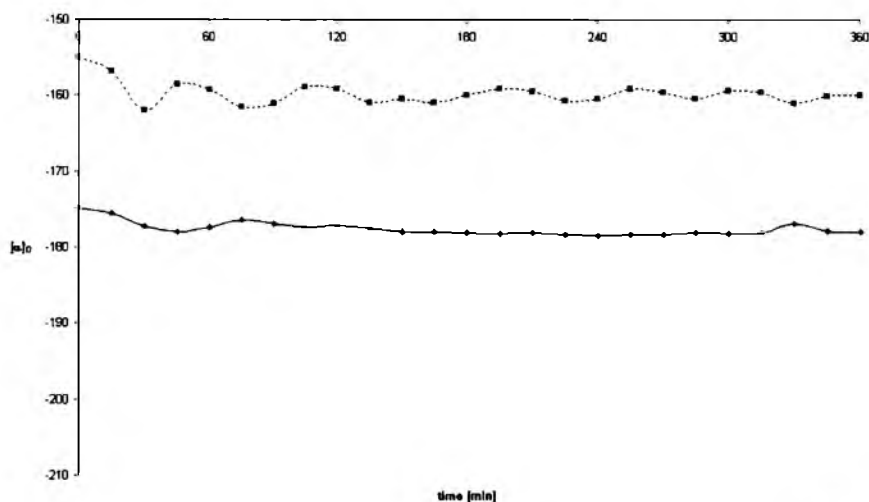


Rys. 73. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla kwasu *R*-(-)-migdałowego rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ [236].

Wynik ciągłej rejestracji zmian skręcalności właściwej roztworu kwasu *R*-(-)-migdałowego w funkcji czasu stanowi kolejny dowód na to, iż obserwowane zmiany mają charakter oscylacyjny.

Krzywe przedstawione na Rys. 72 i 73 są w swoim charakterze podobne do tych, jakie zamieszczono na Rys. 51 i 52, a które dotyczą *D*-(-)- α -fenyloglicyny. W obu przypadkach obserwujemy oscylacyjne zmiany wartości skręcalności właściwej, ale główne trendy wykresów nie zmierzają do zera, co wskazuje na brak szybkiej racemizacji. Odwrotną sytuację mamy w przypadku antymerów (+) α -fenyloglicyny i kwasu migdałowego (Rys. 49 i 69). Co ciekawe, w przypadku profenów (pochodnych kwasu propionowego) to antymery (-) mają większą tendencję do racemizacji niż antymery (+) (porównaj Rys. 41 i 42). Przyczyna takiego zachowania może tkwić w długości łańcucha danego chiralnego kwasu karboksylowego, lub też klasy chemicznej, do jakiej należą badane związki.

W trzecim doświadczeniu skręcalność właściwa $[\alpha]_D$ roztworów kwasu *R*-(-)-migdałowego była mierzona w sposób nieciągły przez okres 6 godzin w dwóch temperaturach: $9\pm 1^\circ\text{C}$ i $22\pm 1^\circ\text{C}$. W żadnym z tych dwóch przypadków skręcalność właściwa nie pozostawała niezmienna w czasie. Przeciwnie, obserwowano oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej w czasie trwania całego eksperymentu. Amplituda tych zmian była jednakże mniejsza w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$, niż w temperaturze $9\pm 1^\circ\text{C}$. Na Rys. 74 przedstawiono wyniki uzyskane w trzeciej serii doświadczeń.



Rys. 74. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla kwasu *R*-(-)-migdałowego rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3 przechowywanego w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$ (linia ciągła) i $9\pm 1^\circ\text{C}$ (linia przerywana) [235].

Również w przypadku kwasu *R*-(-)-migdałowego udało się wykazać wpływ czynnika dyfuzyjnego poprzez obniżenie temperatury badanego roztworu, co wiąże się ze wzrostem jego lepkości. Amplituda oscylacji jest w tym przypadku taka sama, jak dla kwasu *S*-(+)-migdałowego (Rys. 71).

Wyniki badań przeprowadzonych techniką chiralnej chromatografii cienkowarstwowej oraz badań polarymetrycznych zdają się jednoznacznie wskazywać na to, iż kwas *R*-(-)-migdałowy może ulegać oscylacyjnej inwersji chiralnej, po uprzednim rozpuszczeniu go w zawierających wodę rozpuszczalnikach niskocząsteczkowych.

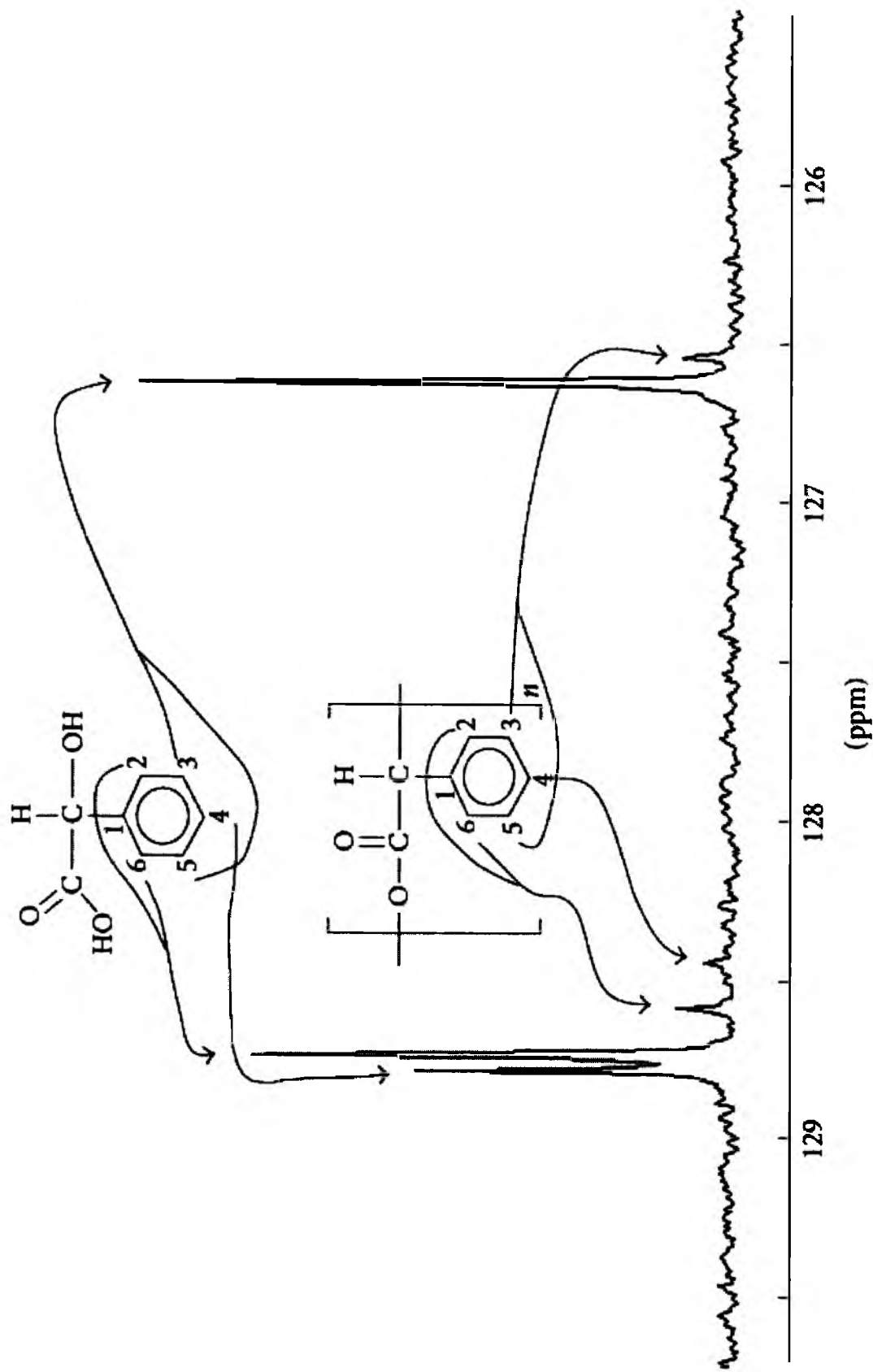
Badania polarymetryczne stanowią istotne poparcie dla wniosków wyprowadzonych na podstawie wyników chromatografii cienkowarstwowej, a dotyczących odkrycia i śledzenia przebiegu oscylacyjnej inwersji chiralnej antymerów *S*-(+) i *R*-(-) kwasu migdałowego, wskazując przy tym na rozpuszczalnik etanolowo-wodny i czas przechowywania jako na czynniki istotnie wpływające na zainicjowanie i przebieg tego procesu.

7.4.3.3. Spektroskopia węglowego magnetycznego rezonansu jądrowego (^{13}C NMR)

W celu dodatkowego zademonstrowania obserwowanego procesu kondensacji kwasu migdałowego przy pomocy innej, niż chromatografia cienkowarstwowa, techniki analitycznej, etanolowy roztwór antymeru *S*-(+) poddano badaniu techniką spektroskopii ^{13}C NMR. Odpowiedni eksperyment został przeprowadzony w następujący sposób. Po 10 dniach przechowywania próbki w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$ odparowano z niej etanol, zastępując go deuterowanym chloroformem (CDCl_3), a następnie zarejestrowano widmo ^{13}C NMR. Na Rys. 75 widoczny jest zakres aromatyczny widma ^{13}C NMR dla kwasu *S*-(+)-migdałowego.

W widmie tym obserwujemy, iż w sąsiedztwie sygnału pochodzącego od aromatycznych atomów węgla 3 i 5 (126,76 ppm) nie skondensowanego kwasu *S*-(+)-migdałowego pojawia się dodatkowy i mało intensywny pik (126,68 ppm). Można go przypisać sygnałowi pochodzącemu od analogicznych atomów węgla w poszczególnych jednostkach skondensowanego polikwasu. Sygnałom pochodzącym od aromatycznych atomów węgla 2 i 6 oraz od aromatycznego atomu węgla 4, widocznym odpowiednio przy 128,88 i 128,93 ppm, również towarzyszą piki niskiej intensywności przy 128,74 i 128,59 ppm, które można przypisać analogicznym atomom węgla w poszczególnych jednostkach skondensowanego polikwasu. Przesunięcia chemiczne dla alifatycznych atomów węgla znajdujących się na końcach łańcucha polikwasu winny być dostrzegalnie różne od przesunięć chemicznych pochodzących od alifatycznych atomów węgla ulokowanych w środku tego łańcucha. Takie sygnały nie są jednak widoczne w przedstawionym widmie, co sugeruje wysoką liczbę skondensowanych jednostek monomerycznych, a więc tworzenie się względnie długiego łańcucha skondensowanego polikwasu.

Badania przeprowadzone techniką spektroskopii ^{13}C NMR w pełni potwierdzają wyniki pochodzące z chromatografii cienkowarstwowej, a świadczące o tym, że kwas migdałowy łatwo ulega samorzutnej polikondensacji.

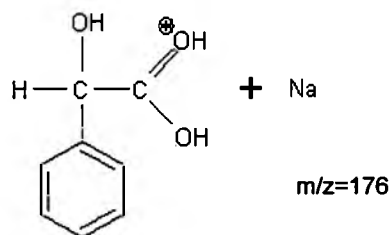


Rys. 75. Widmo ^{13}C NMR, zarejestrowane w temperaturze 25°C , dla kwasu *S*-(+)-migdłowego rozpuszczonego w zdeuterowanym chloroformie (CDCl_3), po 10 dniach przechowywania w roztworze metanolowym [228,236].

7.4.3.4. Achiralna wysokosprawna chromatografia cieczowa

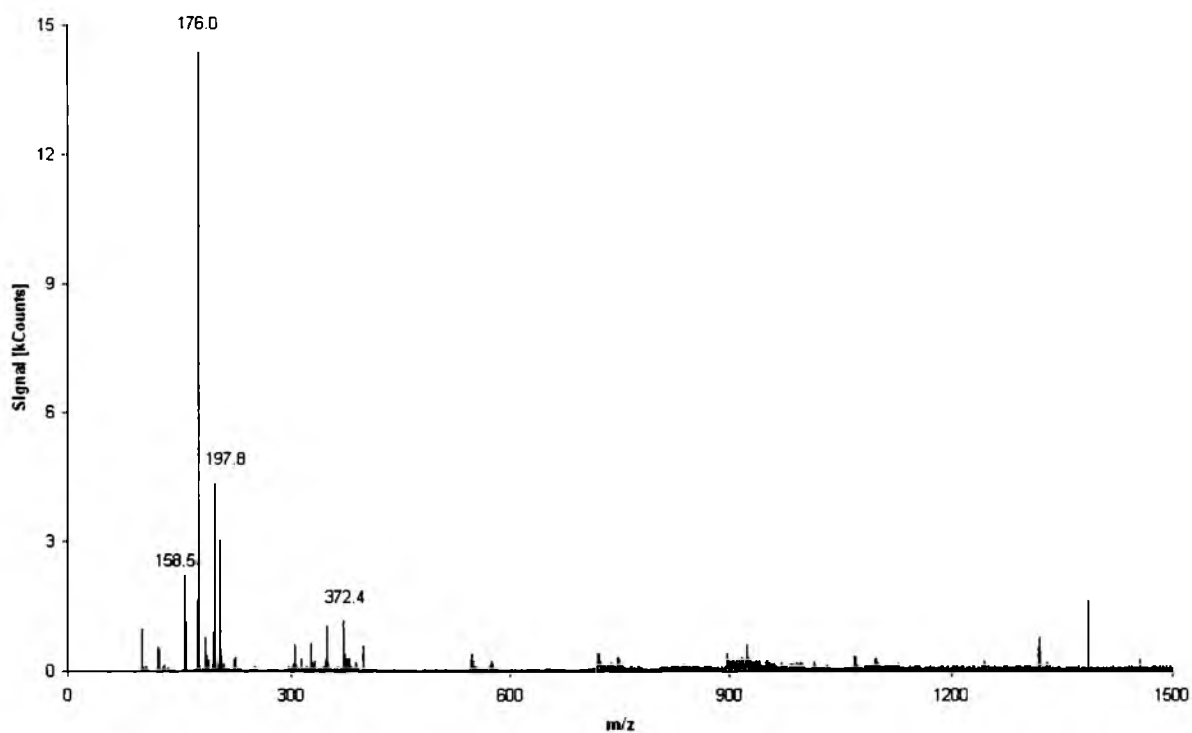
Analogicznie do α -fenyloglicyny, postanowiono prześledzić dynamikę procesu polikondensacji kwasu migdałowego przy pomocy spektrometrii masowej (MS) i achiralnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją na matrycy fotodiodowej (HPLC-DAD). Do badań użyto świeżo sporządzonych oraz przechowywanych przez okres kilku dni i jednego roku roztworów etanolowo-wodnych (7:3, v/v) czystych enancjomerów i racematu kwasu migdałowego (sporządzonego przez zmieszanie optycznie czystych antymerów *S*-(+) i *R*-(-) w stosunku molowym 1:1). Widma masowe były rejestrowane dla całkowitego składu próbki, bez jej wstępnego rozdzielania chromatograficznego.

Na rys. 76 pokazane są widma masowe dla świeżego i jednorocznego roztworu kwasu *S*-(+)-migdałowego. Jeśli te widma potraktować jako fingerprinty, to są one wyraźnie odmienne. Widmo MS rocznej próbki (Rys. 76b) jest bogatsze w sygnały, niż widmo próbki świeżej (Rys. 76a), co jest kolejnym dowodem na zmiany strukturalne materiału wyjściowego, jakim uległ kwas migdałowy w procesie starzenia. W widmie świeżej próbki dominujący pik występuje przy $m/z=176$ i można go przypisać poniższemu kationowi:

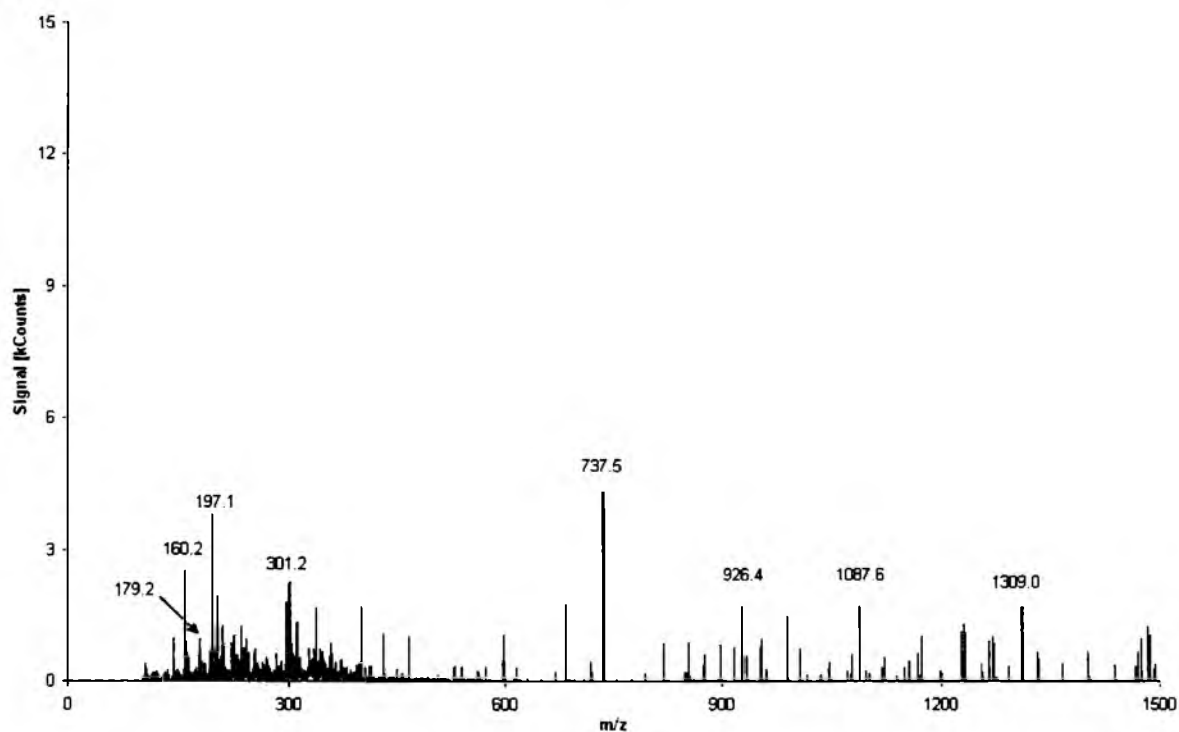


W widmie jednorocznej próbki wzmiankowany kation ma znacznie mniejszy udział względny, za to pik występujący przy $m/z=737$ jest dominujący. Pojawia się też wiele pików przy wyższych wartościach m/z , tj. 926, 1087 i 1309, i prawdopodobnie pochodzą one od określonych form wyższych polikondensatów. Analogiczne wnioski można wyciągnąć dla roztworów kwasu *R*-(-)-migdałowego i kwasu *R,S*-(±)-migdałowego.

(a)



(b)



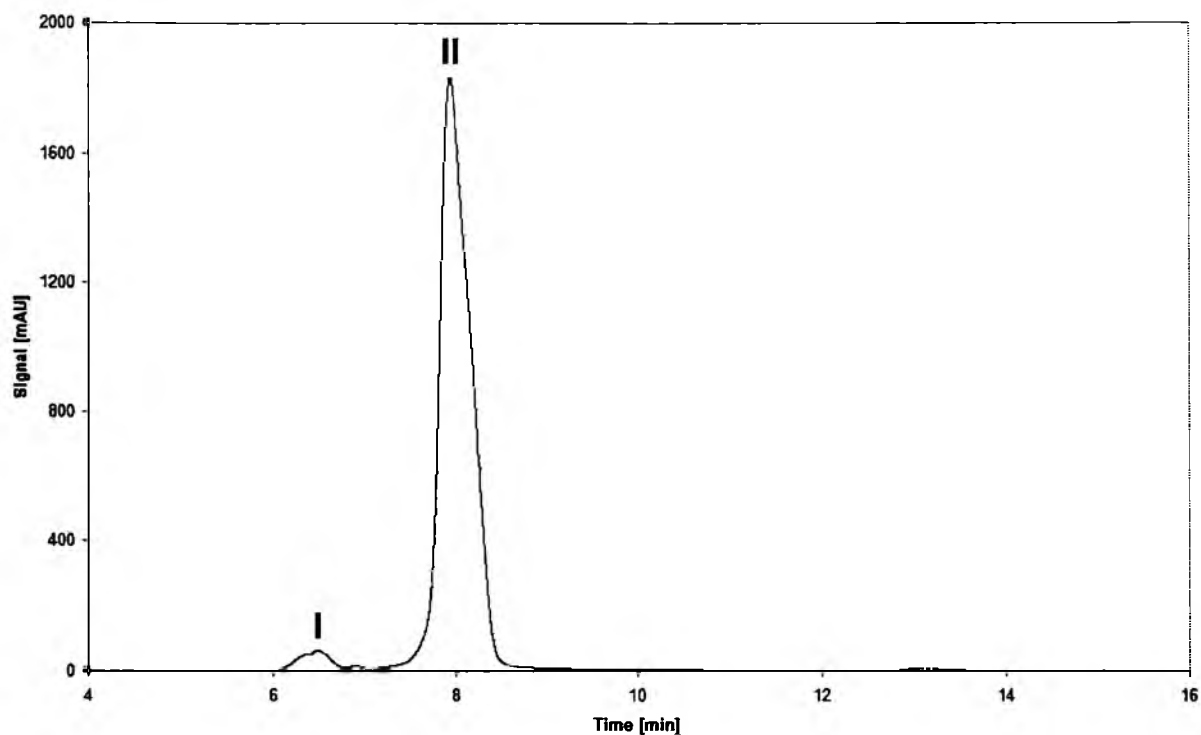
Rys. 76. Widma masowe kwasu *S*-(+)-migdałowego rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, zarejestrowane dla (a) świeżej próbki i (b) próbki przechowywanej przez okres jednego roku w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ [231,237].

W eksperymencie z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD śledzono pojawianie się i zmiany stężenia określonych indywiduów chemicznych podczas procesu starzenia się etanolowo-wodnych roztworów czystych enancjomerów i racematu kwasu migdałowego.

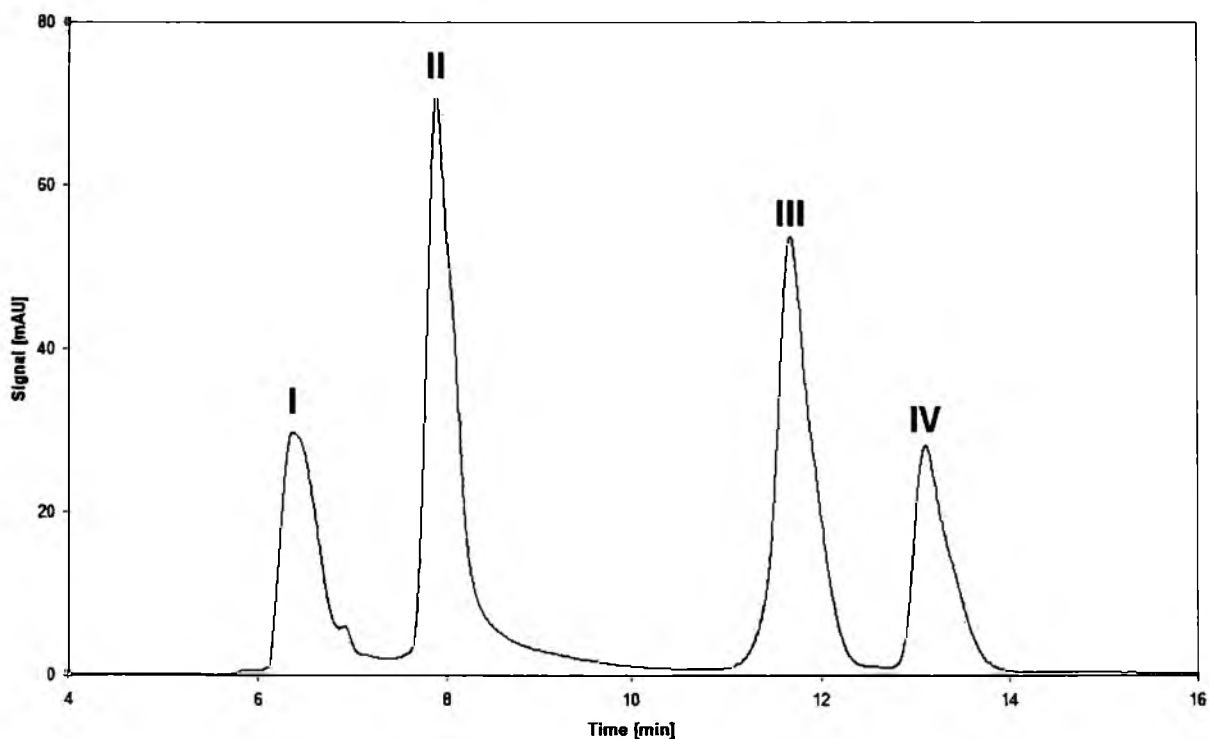
Na Rys. 77 porównano chromatogram świeżo sporządzonego roztworu kwasu *R,S*-(±)-migdałowego z chromatogramem otrzymanym dla roztworu przechowywanego przez okres jednego roku. Na obu występuje jeden dominujący pik II o czasie retencji wynoszącym 8,0 minut, który reprezentuje substancję wyjściową. Następnie można wymienić dwie różnice między oboma chromatogramami. Pierwszą z nich jest liczba pików. Na chromatogramie świeżej próbki widać jeden intensywny pik II, a na chromatogramie próbki jednorocznej kilka dobrze wykształconych pików o zbliżonej intensywności (I-IV). Druga różnica tkwi w wysokościach wzmiankowanych pików. Pik II na Rys. 77a osiąga intensywność wynoszącą 1832 mAV, natomiast na Rys. 77b intensywność ta jest równa 71 mAV. To wskazuje na konsumpcję, jakiej ulega kwas migdałowy w czasie procesu swojego starzenia, trwającego jeden rok. Konsumpcja ta najprawdopodobniej jest związana z samorzutną transformacją strukturalną, prowadzącą do związków o wyższych masach cząsteczkowych, niż kwas migdałowy, na co wskazują piki o stosunkowo wyższych czasach retencji (Rys. 77b).

Ponadto istnieje analogia między Rys. 77b, ilustrującym kilka znaczących pików chromatograficznych (I-IV) o zbliżonych intensywnościach, a Rys. 76b, przedstawiającym piki obecne w widmie masowym o zbliżonych intensywnościach względnych (m/z = 197, 737, 926, 187, 1309). Ta korelacja wskazuje, iż podobnie jak w widmie, tak i na chromatogramie mamy do czynienia z kondensatami kwasu migdałowego. Hipotezę tą wzmacnia korelacja Rys. 76a (widmo masowe próbki świeżej) z Rys. 77b (chromatogram próbki świeżej). Pik chromatograficzny II jest około 20 razy większy od swojego odpowiednika na chromatogramie próbki jednorocznej. Tak samo w widmie masowym pik przy m/z =176 jest około 20 razy intensywniejszy od odpowiadającemu mu pikowi przy m/z =179 na widmie jednorocznej próbki. W tej sytuacji nie ma większego znaczenia, dla którego z antymerów, czy racematu kwasu migdałowego prezentowane są wykresy, ponieważ wyniki dla wszystkich tych próbek są analogiczne. Dalej można przypuszczać, iż zaobserwowane procesy starzenia próbek to przede wszystkim ich samorzutna kondensacja.

(a)



(b)

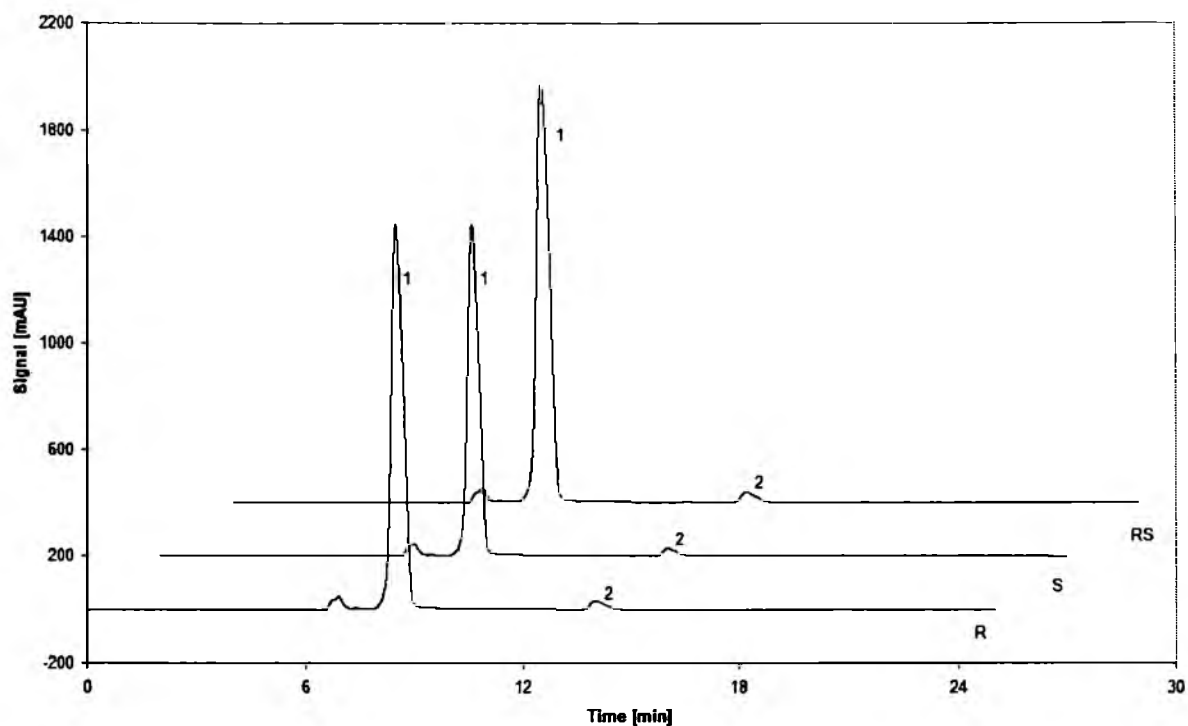


Rys. 77. Chromatogramy kwasu *R,S*(\pm)-migdałowego rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, zarejestrowane przy długości fali 250 nm dla (a) świeżej próbki i (b) próbki przechowywanej przez okres jednego roku w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ [237].

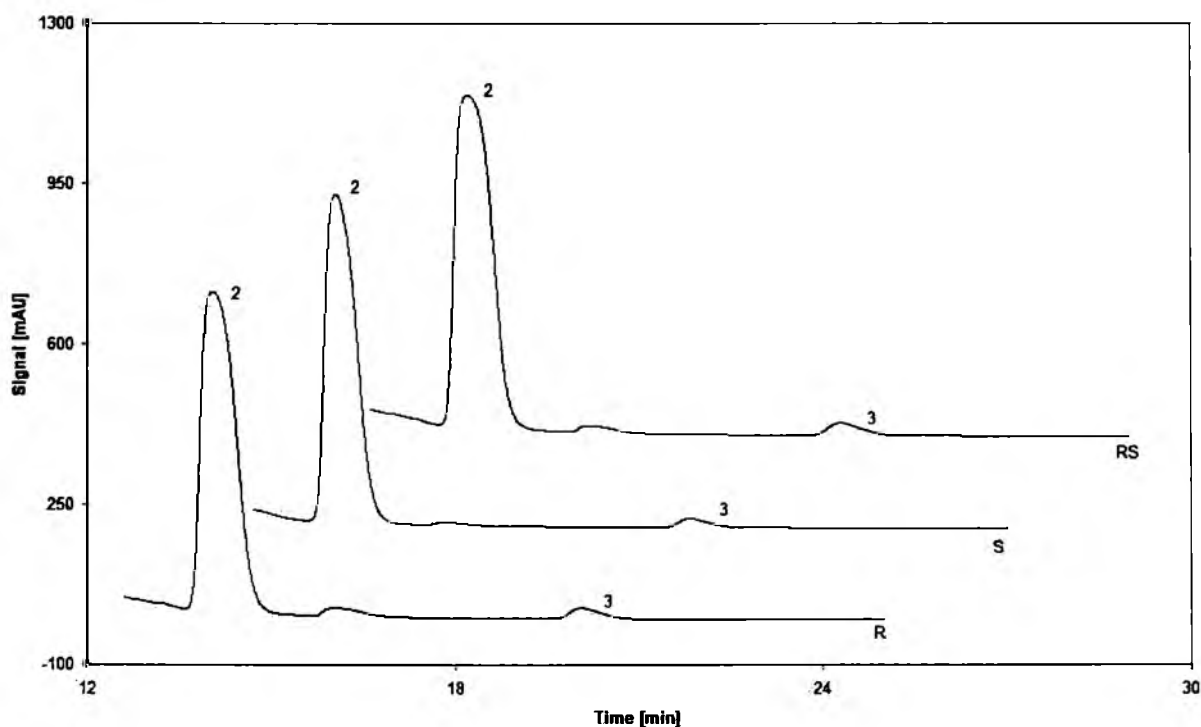
W celu jeszcze lepszego wglądu w dynamikę procesu kondensacji, śledzono czasową ewolucję odpowiednich chromatogramów (tj. rejestrowano je dwa razy dziennie dla etanolowo-wodnych roztworów czystych enancjomerów i dla racematu kwasu migdałowego przez okres 9 dni od ich przygotowania). Rys. 78 przedstawia chromatogramy dla próbek po 8-dniowym okresie ich przechowywania. Pik oznaczony jako 1 został przypisany substancji wyjściowej (odpowiednio *S*-(+), *R*-(-) i *R,S*-(±)), a piki o czasach retencji wyższych, niż 8,0 minut oznaczono jako piki 2 i 3. Ponieważ na chromatogramach rejestrowanych przy długości fali 250 nm pik 2 jest słabo widoczny (Rys. 78a), pokazano również chromatogramy zarejestrowane przy długości fali 202 nm (Rys. 78b), gdzie wyraźnie widać pik 2 i dodatkowo pojawia się pik 3. Oba te piki można przypisać odpowiednim produktom kondensacji kwasu migdałowego. Jak widać, pojawiają się one już po 8 dniach od chwili sporządzenia odpowiednich roztworów.

Kolejno starano się stwierdzić, czy wzrost stężenia produktów kondensacji zachodzi w sposób monotoniczny, czy też oscylacyjny. W tym celu sporządzono wykresy zmian wysokości poszczególnych pików na chromatogramach zarejestrowanych przy długościach fal: 250 nm dla pików 1, 208 nm dla pików 2 i 202 nm dla pików 3. Wysokości te są proporcjonalne do odpowiednich stężeń przypisywanych im kondensatów, natomiast wybór różnych długości fal miał na celu zapewnienie możliwie najwyższych wartości intensywności, a co za tym idzie możliwie najdokładniejszej kwantyfikacji czasowych zmian wysokości dla każdego pików. Na Rys. 79 przedstawiono zmiany wysokości pików 1-3 (numery jak na Rys. 78) w zależności od czasu przechowywania roztworów kwasu migdałowego. Wyraźnie widać, iż wysokości pików zmieniają się w sposób niemonotoniczny, co wskazuje na oscylacyjną naturę procesu kondensacji. Z Rys. 79 można odczytać, iż wysokości pików 1 maleją, a wysokości pików 2 i 3 rosną, co dodatkowo wspiera hipotezę, że pik 1 reprezentuje czysty kwas migdałowy, a piki 2 i 3 reprezentują produkty jego kondensacji. Ponadto, jeśli porówna się wszystkie krzywe na Rys. 79, to można stwierdzić, iż niezależnie od tego, czy badaną próbką jest kwas *S*-(+)-, czy *R*-(-)-migdałowy, czy też odpowiedni racemat, okresowość obserwowanych zmian oscylacyjnych jest bardzo zbliżona.

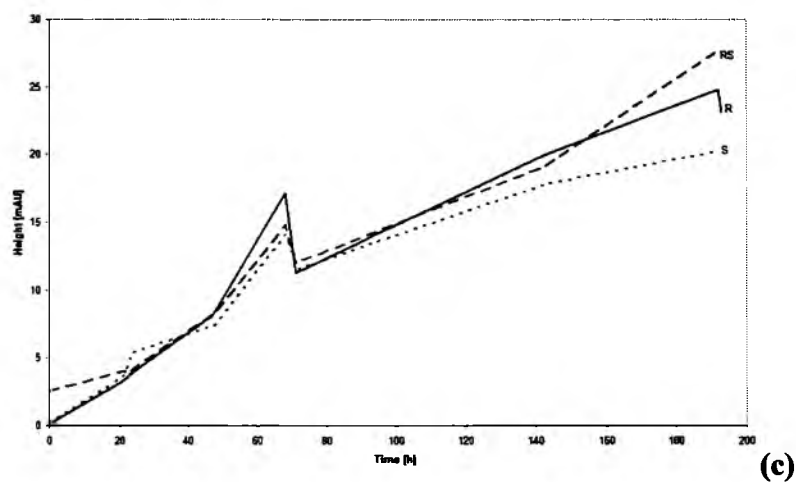
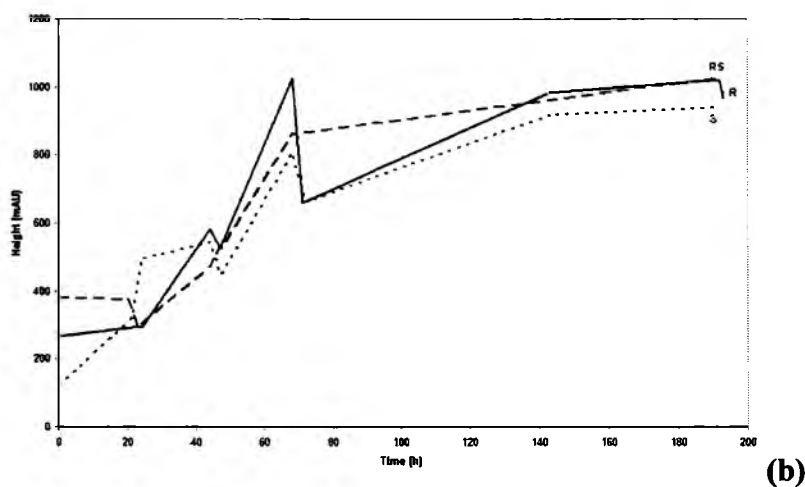
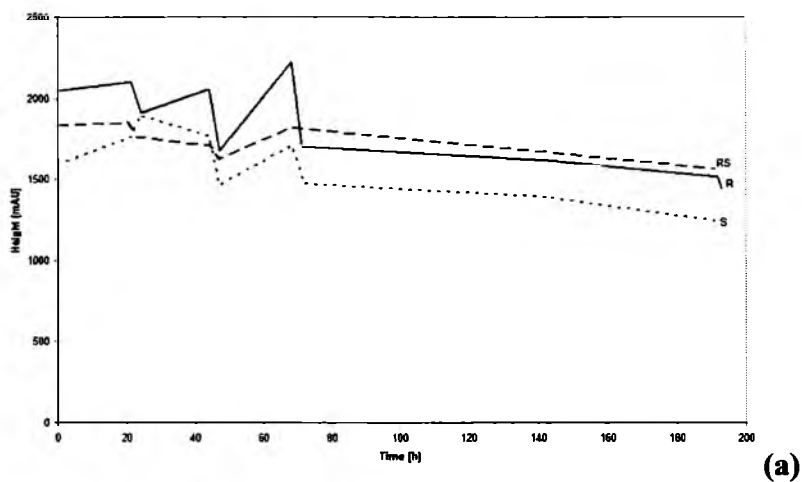
(a)



(b)



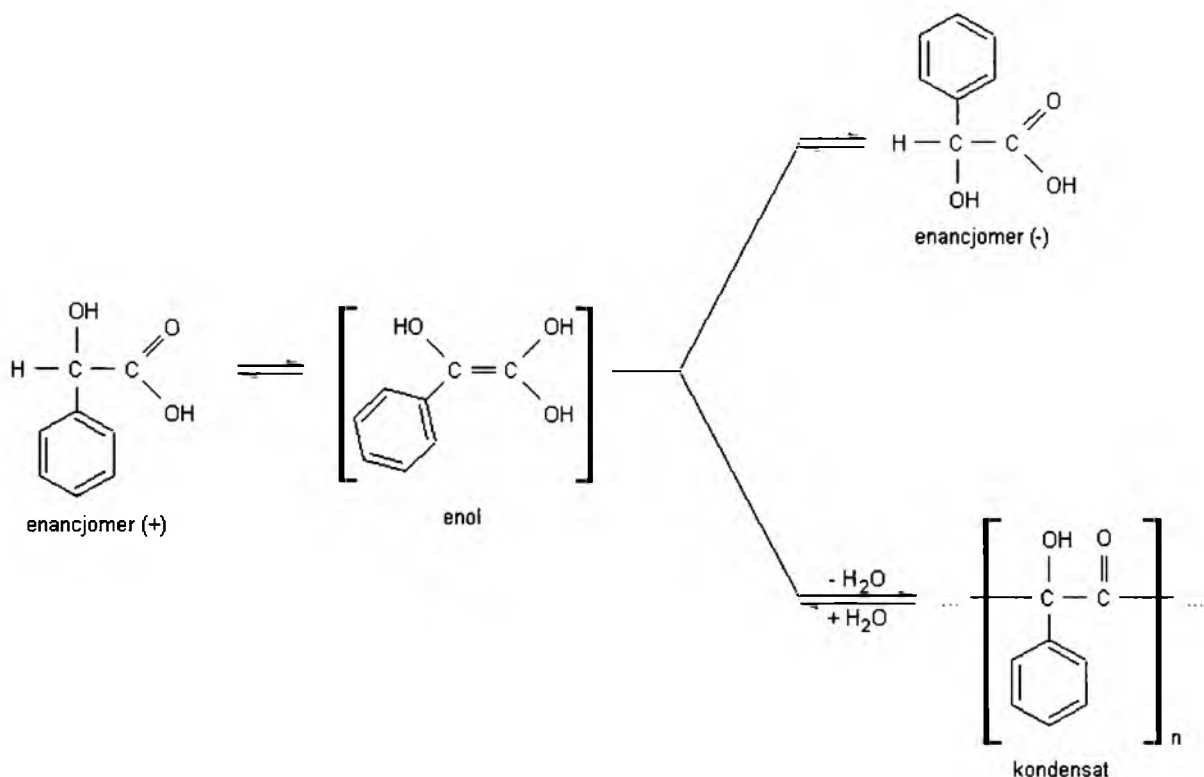
Rys. 78. Chromatogramy kwasu *S*-(+)-migdałowego (S), kwasu *R*-(-)-migdałowego (R) i kwasu *R,S*-(±)-migdałowego (RS), rozpuszczonych w mieszaninach dwuskładnikowych etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, dla próbek przechowywanych przez okres 8 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ i zarejestrowanych przy długości fali (a) 250 nm i (b) 202 nm [237].



Rys. 79. Zmiany wysokości pików chromatograficznych dla kwasu *S*-(+)-migdałowego (S), kwasu *R*-(-)-migdałowego (R) i kwasu *R,S*-(±)-migdałowego (RS), rozpuszczonych w mieszaninach dwuskładnikowych etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3 i przechowywanych przez okres 9 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. (a)

Krzywe zmian dla pików 1 (zarejestrowanego przy długości fali 250 nm), (b) krzywe zmian dla pików 2 (zarejestrowanego przy długości fali 208 nm) i (c) krzywe zmian dla pików 3 zarejestrowanego przy długości fali 208 nm [237].

Przedstawione tutaj wyniki eksperymentu przemawiają (podobnie jak te otrzymane przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej) za tym, że kwas migdałowy w formie optycznie czystej, a także racemicznej, obok inwersji chiralnej może ulegać polikondensacji, co w rezultacie prowadzi do powstawania polikwasów o różnej liczbie skondensowanych jednostek monomerycznych. Oba te procesy są ze sobą sprzężone, zachodząc w sposób niemonotoniczny, a nawet oscylacyjny. Najbardziej prawdopodobny mechanizm procesu chiralnej inwersji hydroksykwasów aromatycznych prowadzi poprzez produkt pośredni – enol. Proces chiralnej inwersji można traktować jako równoległy do procesu polikondensacji, co dla kwasu migdałowego w uproszczony sposób ilustruje Rys. 80.



Rys. 80. Ogólne przedstawienie procesu samorzutnej inwersji chiralnej oraz samorzutnej polikondensacji hydroksykwasu, przebiegających w sposób równoległy [237].

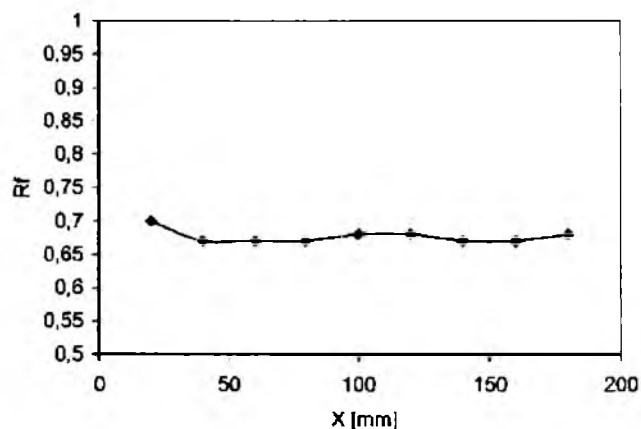
7.4.4. Oscylacyjna inwersja chiralna i oscylacyjna polikondensacja ketoprofenu

7.4.4.1. Chromatografia cienkowarstwowa

Celem niniejszych badań było eksperymentalne stwierdzenie, czy enancjomery ketoprofenu ulegają inwersji chiralnej, to znaczy przemianie antymeru *S*-(+) w *R*-(-) i odwrotnie, jak to przedstawiono równaniem (13). W niniejszych badaniach zastosowano dwa układy chromatograficzne: chiralny i achiralny. Warunki rozdziału dla chiralnego układu TLC były wzorowane na danych zawartych w publikacji Bhushana i Parshada [222], którzy jako pierwsi opracowali warunki rozdziału chromatograficznego dla antymerów ibuprofenu. Jako fazę stacjonarną wykorzystano gotowe płytki pokryte żelem krzemionkowym i zaimpregnowane metanolem z roztworem *L*-argininy. Faza ruchoma składała się z acetonitrylu i wody (5:1, v/v) oraz 0,5% lodowatego kwasu octowego. Kwasu octowego użyto do sprotonowania grupy aminowej *L*-argininy i dzięki temu rozdział enancjomerów był oparty na mechanizmie tworzenia par jonowych, według równań (14) i (15), tak samo, jak dla flurbiprofenu. W przypadku układu achiralnego fazą stacjonarną były gotowe płytki pokryte czystym żelem krzemionkowym, a fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i wody (5:1, v/v) z dodatkiem 0,5% lodowatego kwasu octowego.

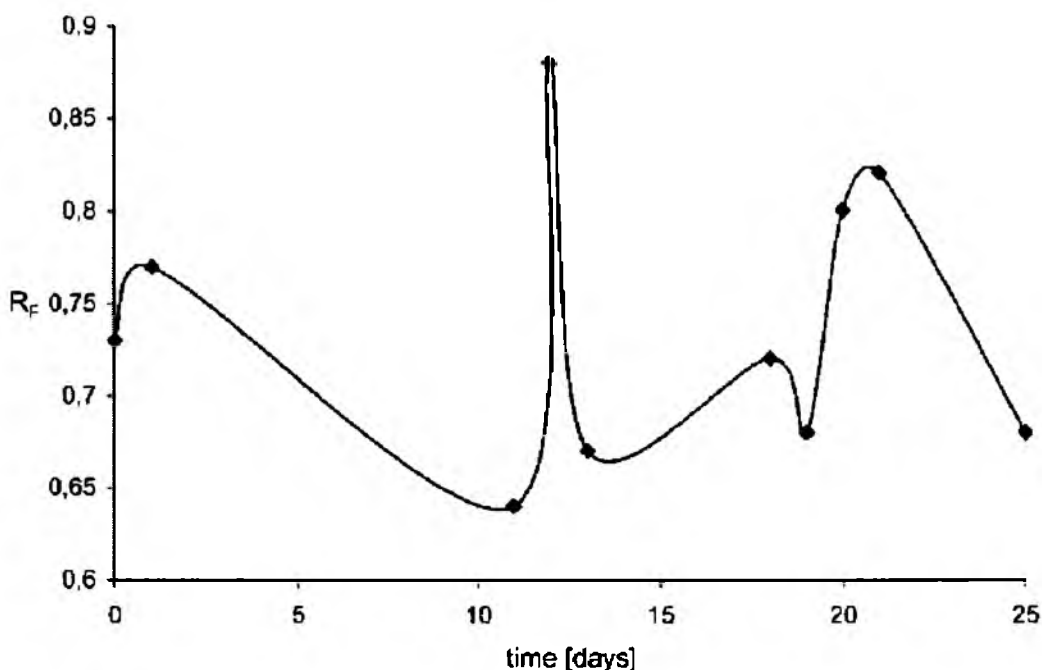
Do eksperymentu chromatograficznego użyto roztworu *R,S*-(±)-ketoprofenu w mieszaninie etanolu i wody w stosunku objętościowym 7:3 oraz trzech roztworów *S*-(+)-ketoprofenu w mieszaninach: etanol-woda (7:3, v/v), etanol-lodowaty kwas octowy (7:3, v/v) i etanol-bufor o pH=9 (7:3), każdy o stężeniu 0,1 mg cm⁻³. Wszystkie roztwory były przechowywane przez okres 26 dni. Rozwijanie chromatogramów prowadzono w wariancie jednokierunkowym i dwukierunkowym w temperaturze 22±1°C.

Rozwijanie jednokierunkowe chromatogramów z zastosowaniem roztworu *R,S*-(±)-ketoprofenu przyniosło wyniki świadczące o zachodzeniu inwersji chiralnej w przypadku tego związku. Szybkość zachodzenia badanego procesu okazała się proporcjonalna do szybkości automatycznej aplikacji próbki na płytkę chromatograficzną (nanoszenie jednej próbki trwało około 30 s). W rezultacie, po rozwinięciu płytki, pozycje poszczególnych plamek ułożyły się wzdłuż linii falistej, co pokazano na Rys. 81. Wynikało to z różnych wartości współczynnika retardacji dla poszczególnych plamek, które zostały wyznaczone z pozycji maksimów pików obecnych na densytogramach dla poszczególnych pasm chromatograficznych.



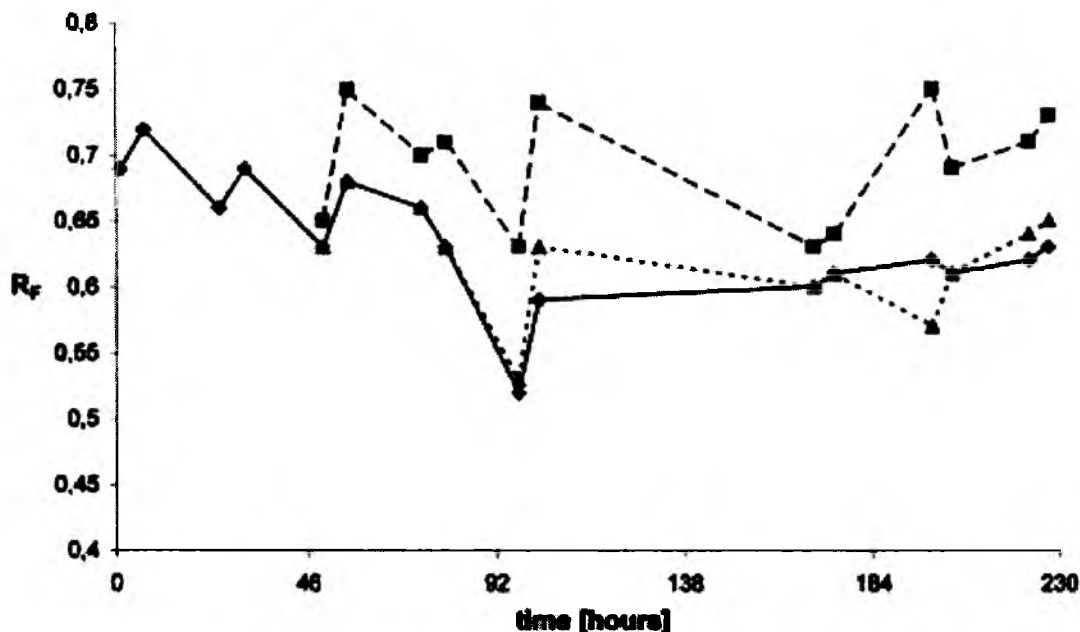
Rys. 81. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika retardacji (R_F) w zależności od chwili atomatycznej aplikacji $R,S(\pm)$ -ketoprofenu na warstwę fazy stacjonarnej (X oznacza pozycję nanoszenia próbki, zaczynając od lewej krawędzi płytki) [238].

Jeszcze wyraźniejszy obraz zmieniających się wartości R_F można pokazać dla dłuższego okresu (26 dni) przechowywania etanolowo-wodnego roztworu racematu ketoprofenu. Na Rys. 82, ilustrującym zmiany współczynnika retardacji w czasie, poszczególne punkty stanowią średnie z dziewięciu wartości R_F dla plamek z jednego chromatogramu w odpowiednim dniu eksperymentu. Amplituda zmian współczynnika retardacji sięga tutaj wartości 0,25, co daleko wykracza poza błąd pomiaru, który zwykle nie jest większy, niż $\pm 0,02$. Tak różne pozycje występowania maksimum piku mogą świadczyć o zmianach w konfiguracji przestrzeni badanego związku, czyli w naszym przypadku, o inwersji chiralnej. Pozycje maksimum występujących przy skrajnych wartościach R_F można przypisać dwom antymerom ketoprofenu, niższą $R(-)$ -ketoprofenowi, a wyższą $S(+)$ -ketoprofenowi [239].



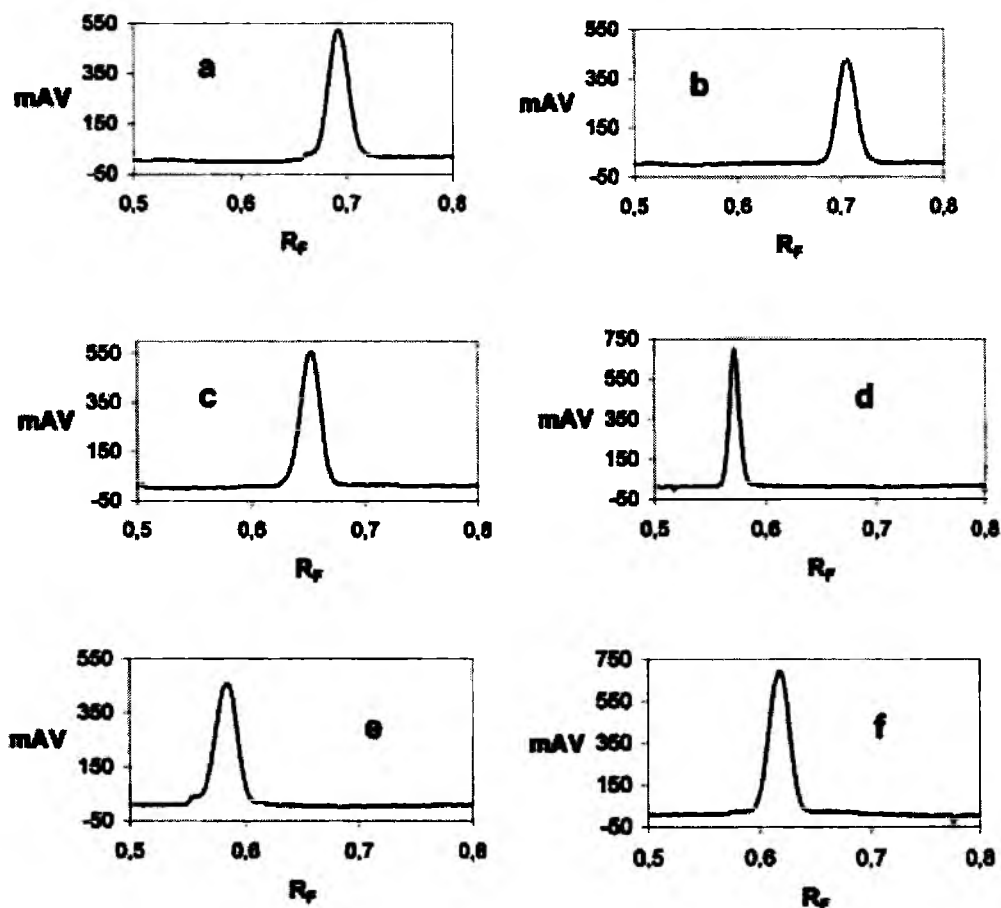
Rys. 82. Zależność współczynnika retardacji (R_F) od czasu przechowywania etanolowo-wodnego roztworu R,S -(\pm)-ketoprofenu w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$ [238].

Wyniki otrzymane dla R,S -(\pm)-ketoprofenu dobrze korespondują z wynikami otrzymanymi z jednokierunkowego rozwijania chromatogramów z użyciem trzech roztworów S -(+)-ketoprofenu. Rys. 83 przedstawia oscylacyjne zmiany współczynnika retardacji w czasie dla S -(+)-ketoprofenu w różnych środowiskach. Zmiany te sięgały wartości od 0,50 do 0,74 dla roztworu etanolowo-wodnego, do 0,63 do 0,75 dla roztworu z rozpuszczalnikiem etanol-lodowaty kwas octowy i od 0,51 do 0,63 dla roztworu z rozpuszczalnikiem etanol-bufor o $\text{pH}=9$. Na podstawie tych danych widać, że amplituda zmian wartości R_F jest dwa razy większa w środowisku obojętnym, niż w pozostałych dwóch środowiskach. Ponadto średnia wartość R_F w środowisku kwaśnym jest wyższa, niż w środowisku zasadowym, co potwierdza wyniki badań zawartych w pracy doktorskiej Piętki [134] świadczące o tym, że obecność kwasu wstrzymuje racemizację, a obecność zasady katalizuje ją. Wyniki te stanowią zatem dodatkowe potwierdzenie, iż wyższe wartości R_F odpowiadają enacjomerowi S -(+) ketoprofenu.



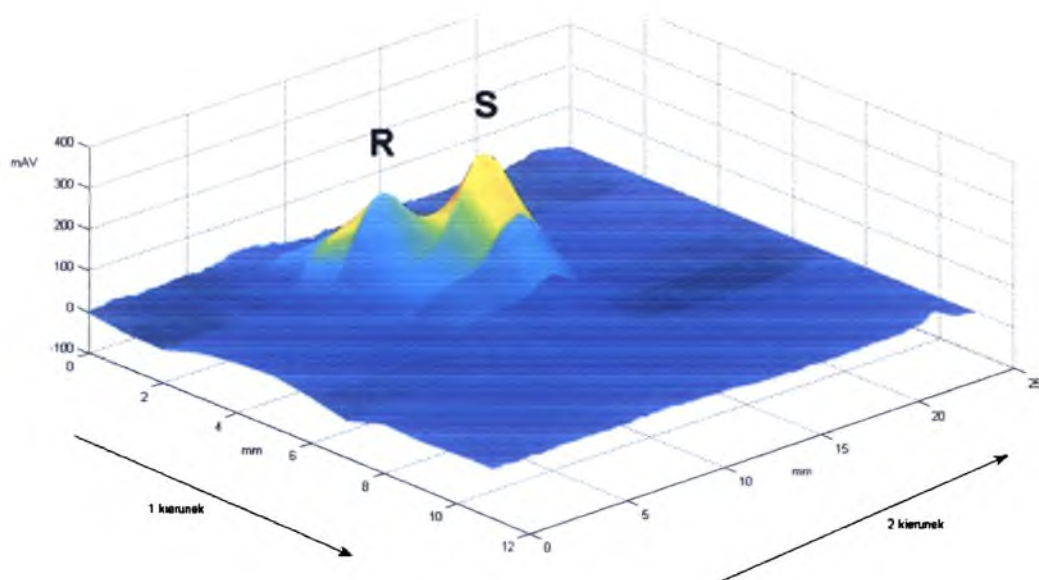
Rys. 83. Zależność współczynnika retardacji (R_F) od czasu przechowywania próbek w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$ dla *S*-(+)-ketoprofenu rozpuszczonego odpowiednio w rozpuszczalnikach (♦) etanol-woda 7:3 (v/v), (■) etanol-lodowaty kwas octowy 7:3 (v/v), (▲) etanol-bufor zasadowy, pH = 9, 7:3 (v/v) [240].

Kolejnym potwierdzeniem zachodzenia inwersji chiralnej w przypadku ketoprofenu jest zaprezentowany na Rys. 84 zestaw profili stężeniowych dla chromatogramów etanolowo-wodnego roztworu *S*-(+)-ketoprofenu zdensytometrowanych po 49,5, 55,5, 79,5, 97,5, 102,5 i 203,5 godzinach przechowywania w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$. Densytogramy te pokazują, że po upływie różnej ilości czasu od chwili sporządzenia roztworu profile stężeniowe wykazują zróżnicowanie w położeniu. W przypadku środowiska kwasowego i zasadowego wyniki były analogiczne z tym, że zakres zmian współczynnika retardacji był mniejszy. Różnice w położeniu profili stężeniowych wynikają z chiralnej labilności badanego związku oraz ze stale i szybko zachodzącej oscylacyjnej inwersji chiralnej. Szybkość zachodzenia tego procesu uniemożliwia uzyskanie rozdziału w systemie jednokierunkowym, jednak udało się otrzymać symetryczne piki pochodzące od pojedynczego antymeru (np. Rys. 84d), lub takie o kształcie asymetrycznym (np. Rys. 84e), który może reprezentować mieszaninę skalemiczną z przeważającą ilością jednego z enancjomerów ketoprofenu.



Rys. 84. Sekwencja sześciu wykresów („stop-klatek”) przedstawiających profile stężeniowe dla roztworu *S*-(+)-ketoprofenu w etanolu z wodą (7:3, v/v), zdensytometrowanych po (a) 49,5, (b) 55,5, (c) 79,5, (d) 97,5, (e) 102,5, oraz (f) 203,5 godzinach przechowywania próbki w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ [240].

Po 26 dniach przechowywania roztworu *S*-(+)-ketoprofenu w środowisku zasadowym, a następnie po zastosowaniu rozwijania chromatogramu w systemie dwukierunkowym udało się rozdzielić powstałą w wyniku inwersji chiralnej mieszaninę skalemiczną ketoprofenu, co pokazano na Rys. 85.

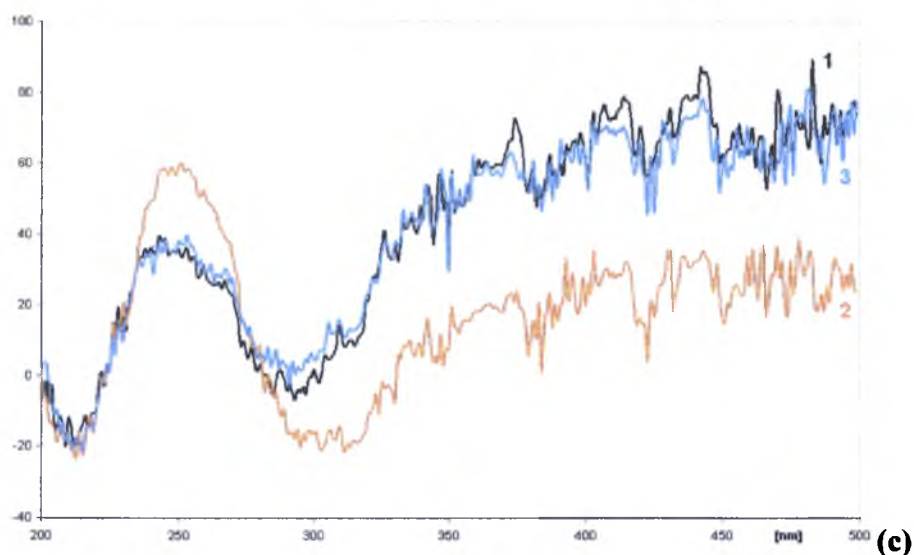
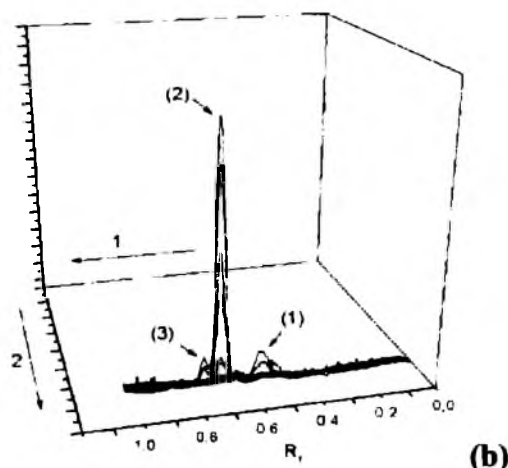
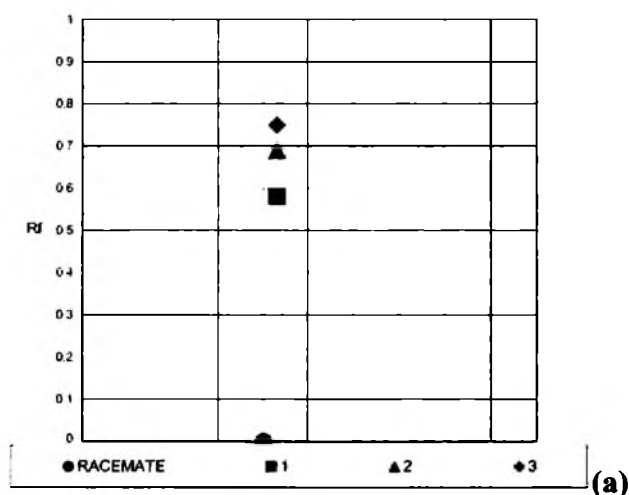


Rys. 85. Trójwymiarowy densytogram przedstawiający rozdział enancjomerów ketoprofenu uzyskany po dwukierunkowym rozwinięciu próbki roztworu *S*-(+)-ketoprofenu w mieszaninie etanol + woda (7:3, v/v) przechowywanego przez okres 26 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Densytogram wygenerowano na podstawie wyników otrzymanych przez skanowanie odpowiednich chromatogramów 30 równoległymi liniami w odstępach 1 mm [240].

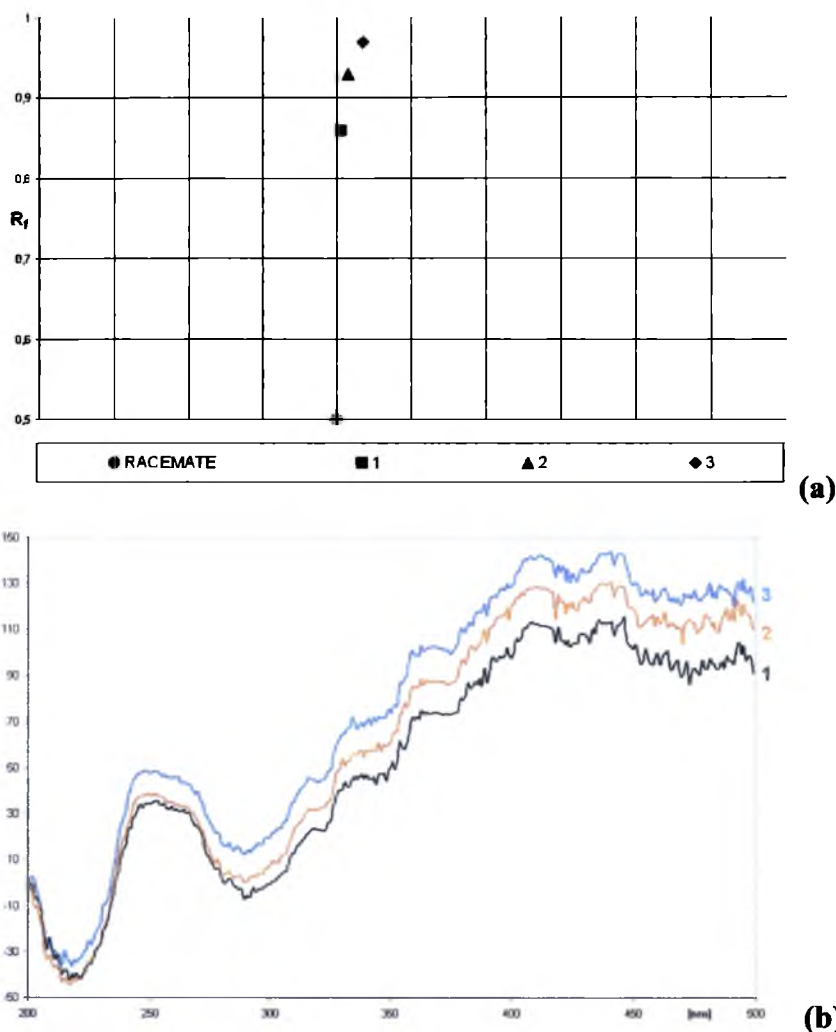
Przy próbach rozdziału *R,S*-(±)-ketoprofenu na poszczególne antymery z zastosowaniem systemu jednokierunkowego w układzie chiralnym, jak również achiralnym, zamiast dwóch pików, odpowiadających dwom enancjomerom ketoprofenu, na densytogramie pojawiły się trzy piki, w dodatku wykazujące znaczne odchylenie w prawo od pionowego kierunku rozwijania. W Tabeli 9 przedstawiono wartości współczynnika retardacji i wielkości odchylenia bocznego dla każdego z pików w wariancie chiralnym i achiralnym, natomiast na Rys. 86a i 87a przedstawiono schemat bocznych odchyłeń od pionowego kierunku rozwijania chromatogramu dla trzech frakcji pochodzących z naniesionej próbki *R,S*-(±)-ketoprofenu.

Tabela 9. Wartość współczynnika retardacji R_F oraz wielkość odchylenia w prawo trzech frakcji (oznaczonych jako piki 1, 2 i 3), rozdzielanych z naniesionej próbki *R,S*-(±)-ketoprofenu.

Pik	Chiralny układ chromatograficzny		Achiralny układ chromatograficzny	
	R_F	Odchylenie [mm]	R_F	Odchylenie [mm]
1	$0,58 \pm 0,02$	2 ± 1	$0,86 \pm 0,02$	1 ± 1
2	$0,69 \pm 0,02$	3 ± 1	$0,93 \pm 0,02$	3 ± 1
3	$0,75 \pm 0,02$	4 ± 1	$0,97 \pm 0,02$	7 ± 1



Rys. 86. Przedstawienie trzech frakcji rozdzielonych z etanolowo-wodnego roztworu *R,S*-(±)-ketoprofenu naniesionego i rozwijanego na płytce chromatograficznej pokrytej żelalem krzemionkowym i zaimpregnowanej *L*-argininą. (a) Schemat odchyleń w prawo pasm chromatograficznych od pionowego kierunku rozwijania chromatogramu. (b) Trójwymiarowy schemat pasm chromatograficznych dla trzech frakcji otrzymanych po rozwinięciu dwukierunkowym. (c) Widma UV zarejestrowane *in situ* z maksimów trzech rozdzielonych pików [238].



Rys. 87. Przedstawienie trzech frakcji rozdzielonych z etanolowo-wodnego roztworu *R,S*-(±)-ketoprofenu naniesionego i rozwijanego na płytce chromatograficznej pokrytej żelalem krzemionkowym. (a) Schemat odchylen w prawo pasm chromatograficznych od pionowego kierunku rozwijania chromatogramu. (b) Widma UV zarejestrowane *in situ* z maksimów trzech pików [241].

Różnice w wartościach R_f dla poszczególnych pików są około półtora razy większe w przypadku układu chiralnego, niż achiralnego, natomiast wielkości odchylen w tym drugim przypadku są większe. Może to wynikać z tego, iż krystaliczna chiralność żelu krzemionkowego jako adsorbentu jest odpowiedzialna za poziomy rozdział enancjomerów, natomiast molekularna chiralność *L*-argininy jako substancji impregnującej warstwę żelu krzemionkowego jest odpowiedzialna za separację w kierunku pionowym [242,243]. Już badania Piętki [134] pokazały, iż rozwijanie chromatogramów w systemie jednokierunkowym na impregnowanym *L*-argininą i czystym żelu krzemionkowym z zastosowaniem profenów (konkretnie ibuprofenu, naproksenu i kwasu 2-fenylpropionowego) jako analitów daje w

rezultacie poziome odchylenie pasm chromatograficznych od kierunku ich migracji w danym układzie chromatograficznym.

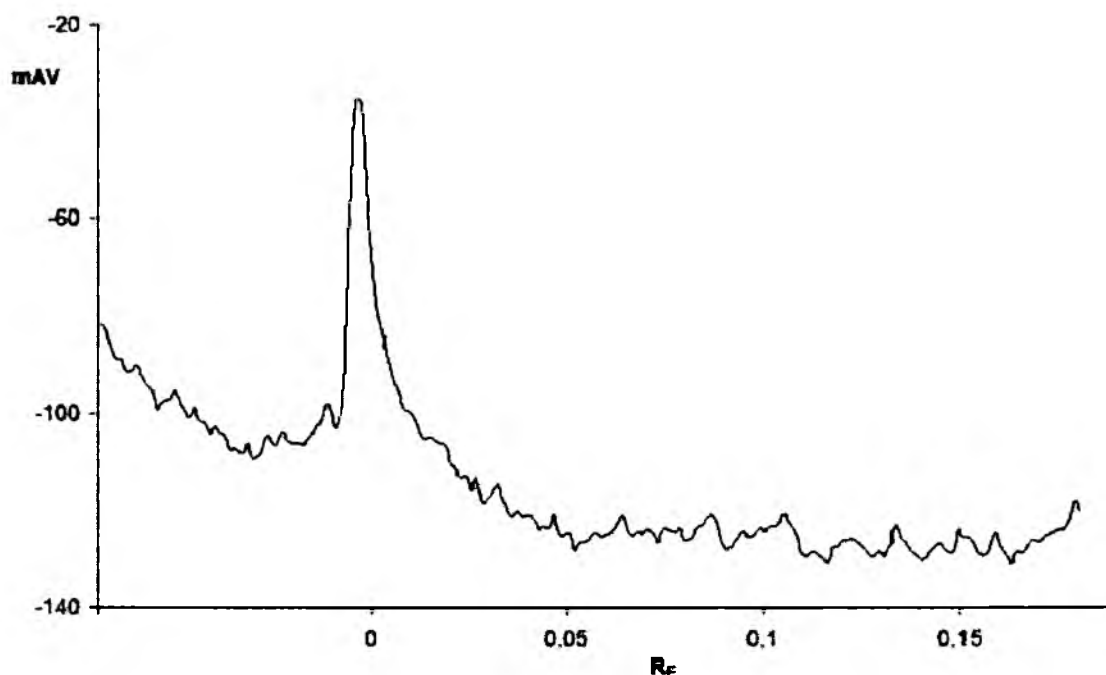
Rys. 86b przedstawia stosunek wysokości trzech pików, z którego wynika, iż ten o pośredniej wartości R_F jest dominujący. W celu wywnioskowania co do natury chemicznej trzech frakcji reprezentowanych na Rys. 86 i 87 przez piki chromatograficzne, zarejestrowano widma UV *in situ* z maksimum każdego z nich. Jak wynika z Rys. 86c i 87b, w każdym przypadku widma były identyczne w kształcie, a różniły się tylko intensywnościami sygnałów. We wszystkich przypadkach maksimum przypadało przy długości fali równej około 252 nm, co odpowiada literaturowej wartości maksimum występującego w widmie ketoprofenu [244,245]. Z podobieństwa zarejestrowanych widm można wnioskować, iż natura chemiczna badanych frakcji jest taka sama, natomiast różnice w intensywnościach prawdopodobnie wynikają z różnych ilości danego indywiduum we frakcji pochodzącej z nanoszonej próbki. Chociaż widma nie pozwalają odpowiedzieć na pytanie, co do konkretnego charakteru chemicznego trzech rozdzielonych frakcji, to istnieją dwa prawdopodobne i alternatywne wyjaśnienia:

- I. Ketoprofen jako kwas monokarboksylowy jest zdolny do tworzenia cyklicznych dimerów asocjacyjnych poprzez wiązania wodorowe. Wydaje się możliwe, iż trzy frakcje stanowią cykliczne dimery asocjacyjne: RR (najmniejsza wartość R_F), SR (średnia wartość R_F) i SS (największa wartość R_F).
- II. Ponieważ ketoprofen ulega inwersji chiralnej zgodnie ze schematem (13), polegającej na tworzeniu się produktu pośredniego (enolu), a ponadto zakładając, że w nanoszonej próbce mamy już do czynienia ze skalematem, a nie z wyjściowym racematem, to również prawdopodobne wydaje się, iż poszczególne frakcje stanowią: enol (najmniejsza wartość R_F), SR (pik dominujący o średniej wartości R_F) i SS (największa wartość R_F).

Drugie z powyższych wyjaśnień wydaje się jednak mniej prawdopodobne, ponieważ w przypadku widm UV rejestrowanych *in situ* dwa antymery ketoprofenu winny dać identyczne widma, podczas gdy enol powinien dać widmo, w którym pozycja maksimum jest nieco inna. Tymczasem widma widoczne na Rys. 86c i 87b są praktycznie identyczne.

Dodatkowo zaobserwowano, iż po rozwinięciu chromatogramu dla etnolowo-wodnego roztworu *R,S*-(±)-ketoprofenu wcześniej przechowywanego przez okres 3 godzin, a następnie po zdensymetrowaniu chromatogramu na linii startu widać pojedynczy pik, co zaprezentowano na Rys. 88. Pik ten pochodzi od indywiduum o większej masie cząsteczkowej, niż pojedyncza cząsteczka ketoprofenu, dlatego też jego wartość R_F wynosi

praktycznie 0, podczas gdy średnia wartość R_F dla ketoprofenu wynosi 0,70. Biorąc pod uwagę analogiczne wyniki otrzymane w przypadku α -fenyloglicyny i kwasu migdałowego można stwierdzić, iż ketoprofen również ulega częściowej kondensacji, w wyniku której tworzą się agregaty zbudowane z kilku cząsteczek profenu, których masa nie pozwala na migrację w zastosowanym układzie chromatograficznym.



Rys. 88. Profil stężeniowy pozostałości na początku chromatogramu otrzymanej dla $R,S-(\pm)$ -ketoprofenu przechowywanego przez okres 3 godzin w mieszaninie etanol-woda (7:3, v/v) [246].

Interesujące zjawisko zaobserwowano dla etanolowo-wodnego (7:3, v/v) roztworu $R,S-(\pm)$ -ketoprofenu, przechowywanego przez okres jednego roku w szczelnie zamkniętych fiolkach w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Mianowicie roztwór ten, będący po sporządzeniu całkowicie homogeniczny i bezbarwny, po roku przechowywania rozwarstwiał się na dwie niemieszające się ze sobą fazy, które po wytrząśnięciu tworzą opalizującą emulsję. Zjawisko to jest o tyle istotne, iż deklarowane przez producentów daty przydatności leków zawierających profeny często sięgają kilku lat od momentu produkcji, a są sprzedawane nie tylko w postaci tabletek, ale również jako zastrzyki, maści, a także syropy. Postanowiono więc sprawdzić zawartość poszczególnych faz pod kątem udowodnionej i stale toczącej się inwersji chiralnej ketoprofenu.

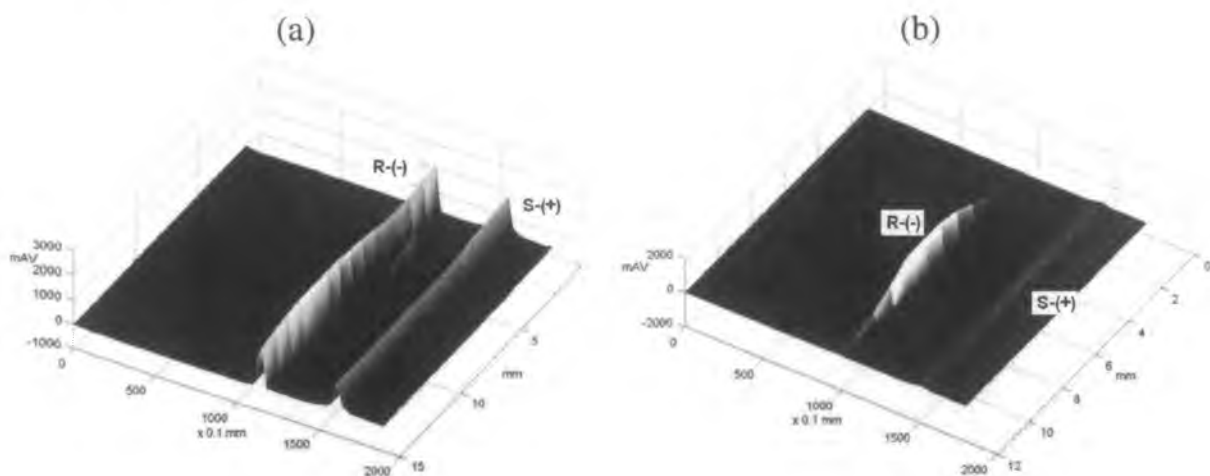
W pierwszej kolejności obie warstwy (fazy) poddano procesowi chromatografowania techniką achiralnej wysokosprawnej chromatografii cieczową z matrycą diodową (HPLC-

DAD). W szczególności zwrócono uwagę na to, czy podczas przechowywania ketoprofen nie uległ rozkładowi, lub przemianie w inny związek chemiczny. Jednak chromatogramy dla obu warstw i widma UV zarejestrowane dla poszczególnych pików jednoznacznie wskazywały na ketoprofen jako na podstawowy składnik rozwarstwowanego roztworu. Dlatego też postawiono hipotezę, iż podstawowym procesem towarzyszącym długoterminowemu przechowywaniu badanego profenu jest zachodząca *in vitro* inwersja chiralna. Aby to potwierdzić, zdecydowano się na przeprowadzenie rozdzału chiralnego metodą chiralnej TLC. Otrzymane wyniki zaprezentowano w postaci Tabeli 10 i Rys. 89.

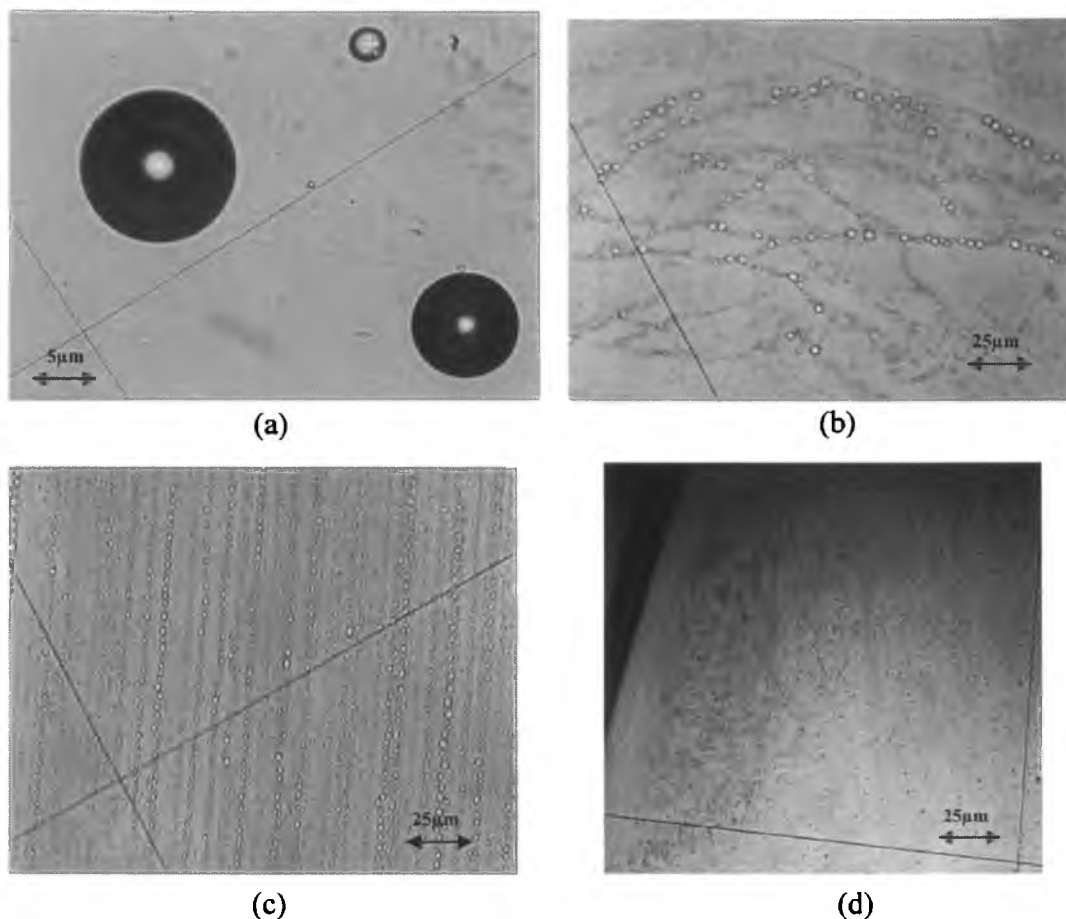
Tabela 10. Zawartości poszczególnych atymerów ketoprofenu szacowane dla dwóch warstw etanolowo-wodnego roztworu *R,S*-(±)-ketoprofenu, powstałych po jednym roku przechowywania próbki. Dane otrzymano w wyniku zastosowania rozdzału metodą chiralnej TLC [247].

Warstwa	Całkowita zawartość ketoprofenu przypadająca na warstwę [%]	R _F		Zawartość antymeru w wybranej warstwie [%]		Nadmiar enancjomeryczny względem antymeru <i>R</i> -(-) (e.e.)* [%]
		<i>R</i> -(-)	<i>S</i> -(+)	<i>R</i> -(-)	<i>S</i> -(+)	
Górna	~30	0,69	0,98	55	45	10
Dolna	~70	0,68	0,98	96	4	92

*e.e.= $\frac{R-S}{R+S}\times 100\%$, gdzie *R* oznacza ilość antymeru *R*, a *S*- ilość antymeru *S* ketoprofenu w danej warstwie



Rys. 89. Trójwymiarowe densytogramy przedstawiające rozdzał enancjomerów ketoprofenu uzyskany po jednokierunkowym rozwinięciu (a) górnej i (b) dolnej warstwy, powstałych w etanolowo-wodnym roztworze *R,S*-(±)-ketoprofenu przechowywanym przez okres jednego roku w temperaturze 22±1°C. Densytogramy wygenerowano na podstawie wyników otrzymanych przez skanowanie odpowiednich chromatogramów 30 równoległymi liniami w odstępach 1 mm [247].



Rys. 90. Struktury zarejestrowane podczas obserwacji mikroskopowych górnej i dolnej warstwy etanolowo-wodnego roztworu *R,S*-(\pm)-ketoprofenu, przechowywanego przez okres jednego roku w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$.
(a) Koncentryczna struktura utworzona w dolnej warstwie widoczna przy powiększeniu 500x. Struktury w postaci **(b)** małych białych punktów tworzących zakrzywione linie, **(c)** małych białych punktów tworzących linie proste oraz **(d)** spirali, wszystkie obecne w górnej warstwie i widoczne już przy powiększeniu 100x [247].

Średnica okrągłych struktur widocznych na Rys. 90 wahała się od kilkudziesięciu do 100 μm . Górna warstwa, posiadająca mniejsze stężenie ketoprofenu, charakteryzowała się występowaniem znacznie mniejszych struktur przestrzennych niż warstwa dolna o większym stężeniu ketoprofenu, jednakże różnice te były raczej natury ilościowej.

Oczywiście obserwowane struktury były ruchome. Ruch ten wynikał z procesów chemicznych i dyfuzyjnych, a nie z konwekcji cieplnej. Aby to udowodnić zastosowano filtr wodny w celu wyeliminowania promieniowania podczerwonego oraz ogrzewania obserwowanej próbki, których źródłem mogła być lampka mikroskopowa. Średnia szybkość poruszania się struktur przestrzennych wynosiła $0,25 \text{ cm min}^{-1}$.

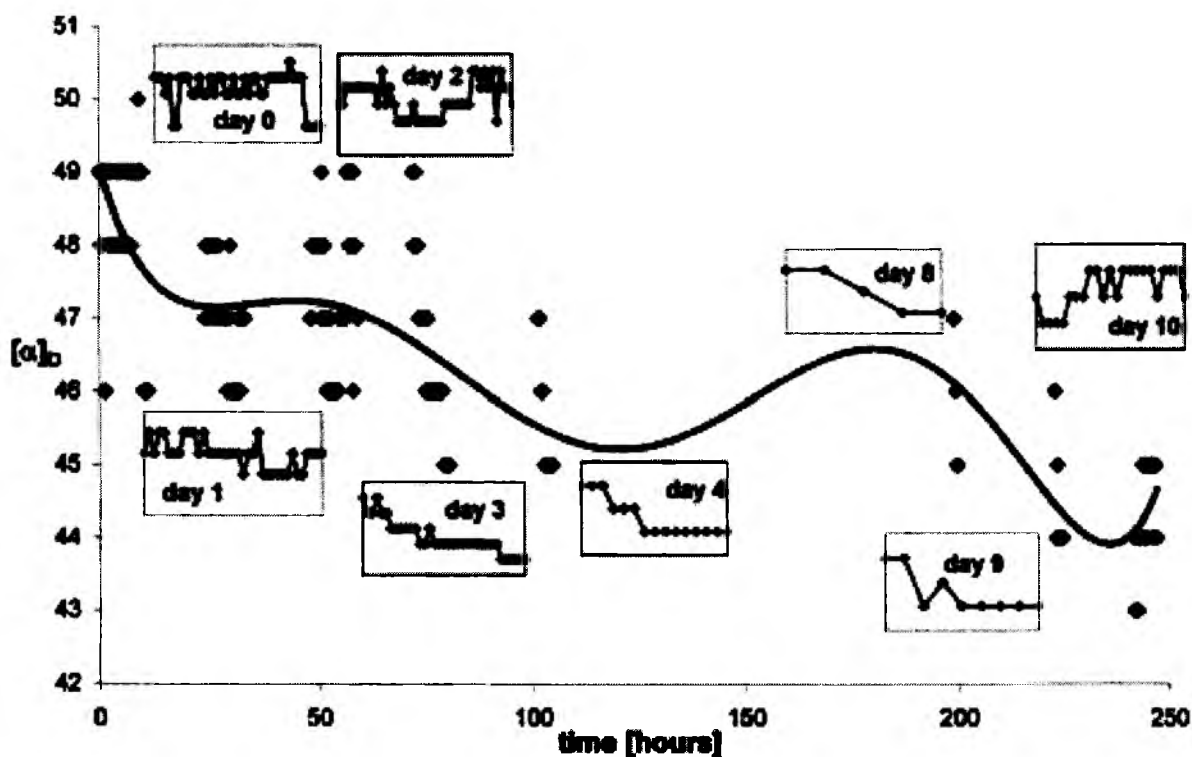
Przedstawione obserwacje sugerują, iż w wyniku samorzutnej oscylacyjnej inwersji chiralnej zachodzącej *in vitro* dochodzi do rozwarstwienia etanolowo-wodnego roztworu *R,S*-(\pm)-ketoprofenu. Prawdopodobnie powodowane jest to anizotropią gęstości wywołanej

procesem żelowania profenów, o której mowa w publikacji [133] i pracy doktorskiej Piętki [134].

Pomiary TLC potwierdzają zdolność enancjomerów ketoprofenu do ulegania spontanicznej oscylacyjnej inwersji chiralnej oraz spontanicznej kondensacji. Możliwe jest, iż te dwa procesy współgrają ze sobą tak jak to przedstawiono przy α -fenyloglicynie i kwasie migdałowym.

7.4.4.2. Polarymetria

Badanie zmian skręcalności właściwej *S*-(+)-ketoprofenu było przeprowadzone w trzech seriach doświadczeń. W pierwszym doświadczeniu zmiany skręcalności właściwej roztworu *S*-(+)-ketoprofenu w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym, przechowywanego przez 10 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$, były rejestrowane w sposób nieciągły prawie codziennie, po kilka godzin dziennie w 15-minutowych odstępach czasu. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rys. 91.

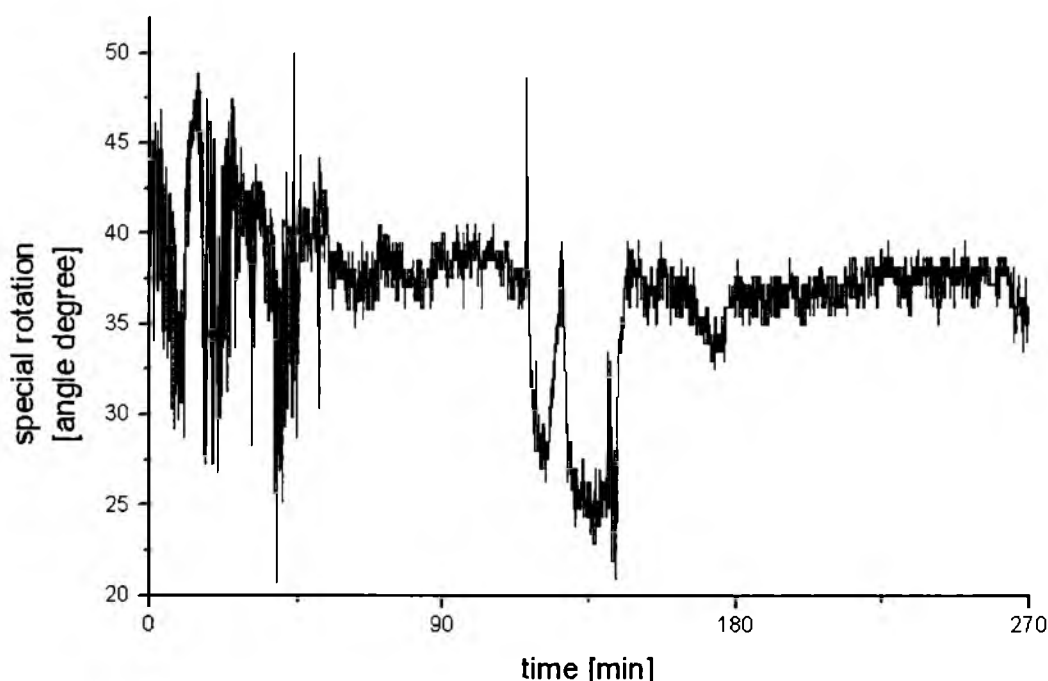


Rys. 91. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla *S*-(+)-ketoprofenu rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Główny kierunek zmian jest zaznaczony linią ciągłą, a wykresy w „okienkach” obrazują zmiany zachodzące w wybranych dniach prowadzenia eksperymentu [240].

Obraz, jaki wyłania się z Rys. 91 ujawnia, iż zmiany skręcalności właściwej były z natury oscylacyjne, co jest najlepiej widoczne w „okienkach” zamieszczonych na tym rysunku, natomiast długoterminowy trend zmian wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ wskazuje na bardzo wolno postępujący proces racemizacji. Rys. 91 jest analogiczny do Rys. 41, na którym prezentowano zmiany skręcalności właściwej dla *S*-(+)-flurbiprofenu. Również tam

długoterminowy trend zmian $[\alpha]_D$ wskazuje na bardzo wolno postępującą racemizację, co zatem wydaje się być regułą dla enancjomerów *S*-(+) profenów.

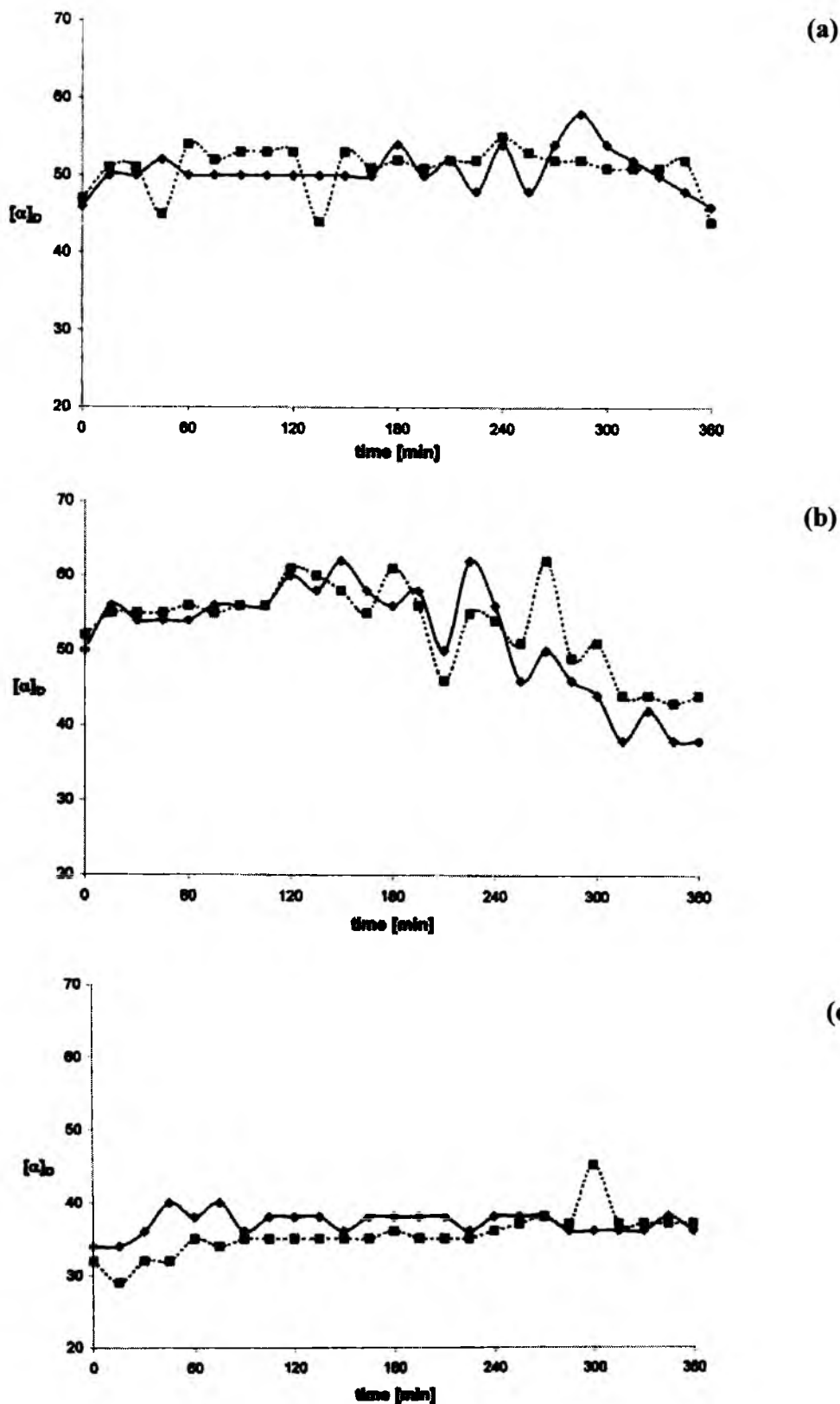
W drugim eksperymencie polarymetrycznym rejestrację oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej przeprowadzono w sposób ciągły, również w temperaturze 22°C przez pierwsze 4,5 godziny od chwili sporządzenia roztworu *S*-(+)-ketoprofenu w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym. Uzyskany wynik przedstawiono na Rys. 92.



Rys. 92. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla *S*-(+)-ketoprofenu rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3, w temperaturze 22±1°C [231].

Wynik ciągłej rejestracji zmian skręcalności właściwej roztworu *S*-(+)-ketoprofenu w funkcji czasu stanowi jeszcze dobitniejszy dowód na to, iż zmiany te miały charakter oscylacyjny. Dodatkowo potwierdza on przypuszczenie, iż obserwowane oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ są rezultatem oscylacyjnej inwersji chiralnej badanego kwasu.

W trzeciej serii doświadczeń skręcalność właściwa $[\alpha]_D$ roztworów *S*-(+)-ketoprofenu była mierzona w sposób nieciągły przez okres 6 godzin w temperaturze 9±1°C. Przeprowadzono dwa równoległe pomiary: jeden dla roztworów poddawanych działaniu ultradźwięków, a drugi dla roztworów nie poddawanych temu działaniu. W żadnym z tych dwóch przypadków skręcalność właściwa nie pozostawała niezmienna w czasie. Przeciwnie, obserwowano oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej w trakcie całego trwania eksperymentu. Na Rys. 93 przedstawiono wyniki uzyskane w trzeciej serii doświadczeń.



Rys. 93. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla roztworów *S*-(+)-ketoprofenu rozpuszczonych w następujących rozpuszczalnikach: (a) etanol-woda 7:3 (v/v), (b) etanol- lodowaty kwas octowy 7:3 (v/v), (c) etanol-bufor zasadowy pH=9, 7:3 (v/v) przechowywanych w temperaturze $9 \pm 1^\circ\text{C}$. Wyniki dla roztworów poddawanych działaniu ultradźwięków i nie poddawanych temu działaniu przedstawiono odpowiednio przy pomocy linii ciągłej i linii przerywanej [240].

Rejestracja zmian skręcalności właściwej w trzeciej serii prowadzonego eksperymentu polarymetrycznego miała na celu wyeksponowanie wpływu czynnika dyfuzyjnego na przebieg obserwowanego procesu, najprawdopodobniej będącego samorzutną, oscylacyjną inwersją chiralną *S*-(+)-ketoprofenu. Wpływ czynnika dyfuzyjnego starano się wyeksponować poprzez obniżenie temperatury badanego roztworu, co wiąże się ze wzrostem jego lepkości oraz przez porównanie przebiegu oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej roztworu mieszanego przy pomocy ultradźwięków oraz roztworu niemieszanego. Silny wzrost amplitudy oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ badanych roztworów, wywołany obniżeniem ich temperatury i jednoczesnym wzrostem ich lepkości wskazuje na bardzo istotną rolę dyfuzji w badanym procesie, jak to ma bardzo często miejsce w przypadku różnych reakcji oscylacyjnych.

Zastosowanie ultradźwięków do mieszania badanych roztworów miało na celu ułatwienie dyfuzji cząsteczek ketoprofenu w tych roztworach, a przez to obniżenie wpływu czynnika dyfuzyjnego na proces inwersji chiralnej i być może częściowe stłumienie, albo nawet wyeliminowanie zjawiska oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej. Tymczasem kształt krzywych pozwala wnioskować, że mieszanie badanych próbek ultradźwiękami nie wpływa znacząco na amplitudę skręcalności właściwej badanych roztworów.

Obecność w roztworze kwasu lub zasady ewidentnie wywiera wpływ na amplitudę oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej. Kwas wzmacnia obserwowaną amplitudę zmian (Rys. 93b) w porównaniu ze środowiskiem obojętnym (Rys. 93a), natomiast zasada tłumia ją oraz obniża wartość skręcalności właściwej (Rys. 93c). Obecność kwasu również obniża wartość $[\alpha]_D$, ale dopiero po upływie kilku godzin, a przez bardzo długi czas ma ona stałą, wysoką wartość. Średnia wartość skręcalności właściwej w obecności kwasu jest wyraźnie wyższa, niż w środowisku zasadowym. Można z tego wnioskować, iż obecność kwasu wstrzymuje proces racemizacji, natomiast zasada katalizuje ten proces, o czym już wspomniano wcześniej.

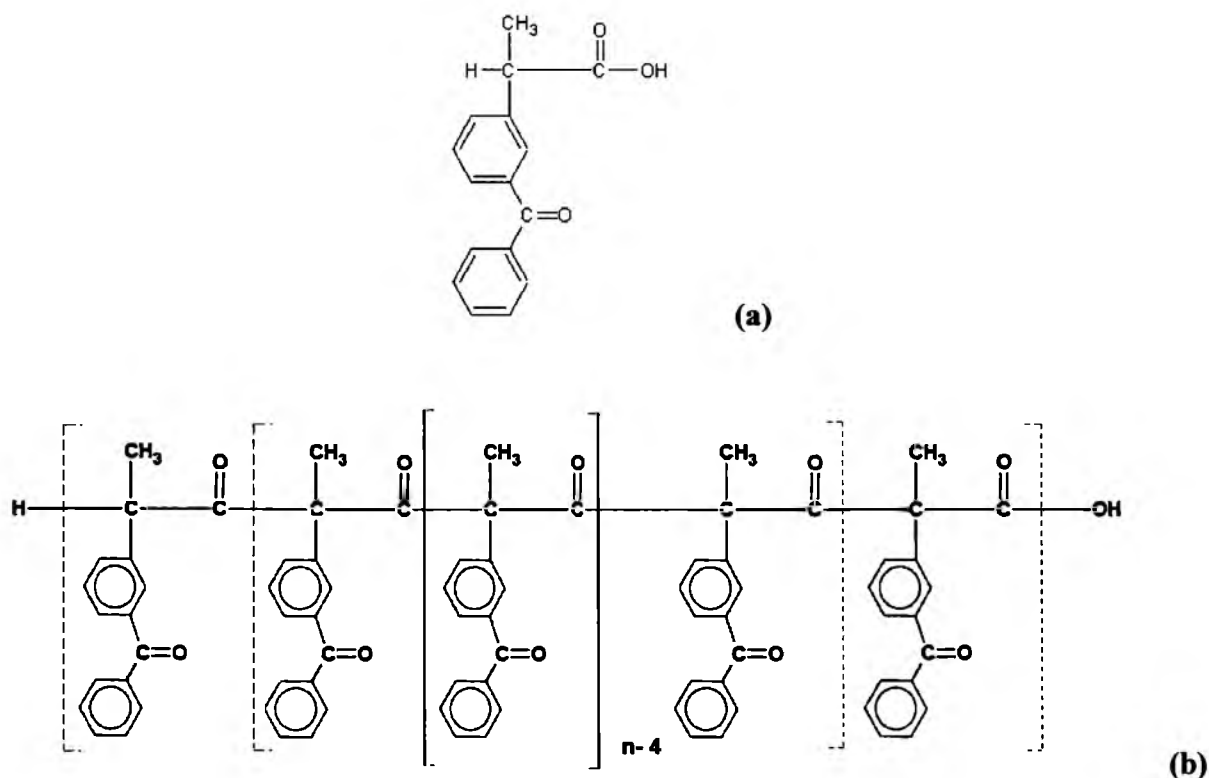
Tak więc wyniki badań przeprowadzonych techniką chromatografii cienkowarstwowej oraz badań polarymetrycznych zdają się jednoznacznie wskazywać na to, iż *S*-(+)-ketoprofen może ulegać oscylacyjnej konwersji chiralnej, po uprzednim rozpuszczeniu w zawierających wodę rozpuszczalnikach niskocząsteczkowych.

Nie oczekiwano żadnej niespodziewanej obserwacji przy pomiarach polarymetrycznych etanolowo-wodnego roztworu *R,S*-(±)-ketoprofenu, a tylko zarejestrowania wartości skręcalności właściwej równej zero. Tymczasem natychmiastowy pomiar skręcalności właściwej zaraz po rozpuszczeniu racematu w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym wykazał

wartość $+4^\circ$, która po 15 minutach spadła do zera i nie zmieniła się przez resztę czasu trwania eksperymentu. Gdy jeszcze raz powtórzono całą procedurę, wartość skręcalności właściwej wyniosła zaraz po rozpuszczeniu racematu -2° i utrzymała się na tym poziomie przez resztę czasu trwania eksperymentu. Przedstawione obserwacje odnośnie do pomiaru skręcalności właściwej racematu ketoprofenu dodatkowo wspierają hipotezę o uleganiu przez ten profen inwersji chiralnej.

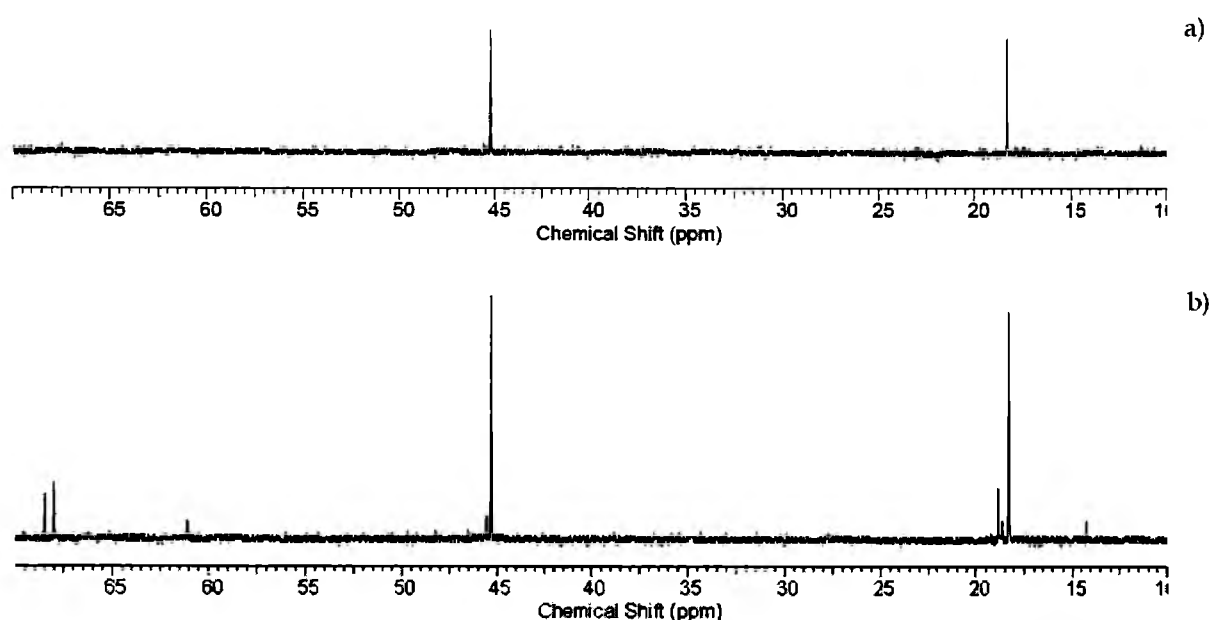
7.4.4.3. Spektroskopia węglowego magnetycznego rezonansu jądrowego (^{13}C NMR)

W celu dodatkowego zademonstrowania obserwowanego procesu kondensacji ketoprofenu przy pomocy innej, niż chromatografia cienkowarstwowa, techniki analitycznej, etanolowy roztwór antymeru *S*-(+) poddano badaniu techniką spektroskopii ^{13}C NMR. Na Rys. 94 przedstawiono wzór strukturalny formy monomerycznej ketoprofenu i prawdopodobną strukturę polikondensatu utworzonego z ketoprofenu. Odpowiedni eksperyment został przeprowadzony w następujący sposób. Zaraz po sporządzeniu oraz po jednym roku przechowywania próbek w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$ odparowano z nich 70% etanol, zastępując go deuterowanym chloroformem (CDCl_3), a następnie zarejestrowano widma ^{13}C NMR. Na Rys. 95-97 przedstawiono trzy zakresy widma ^{13}C NMR: alifatyczny, aromatyczny i karbonylowy dla *S*-(+)-ketoprofenu w roztworze świeżym i przechowywanym przez okres jednego roku.



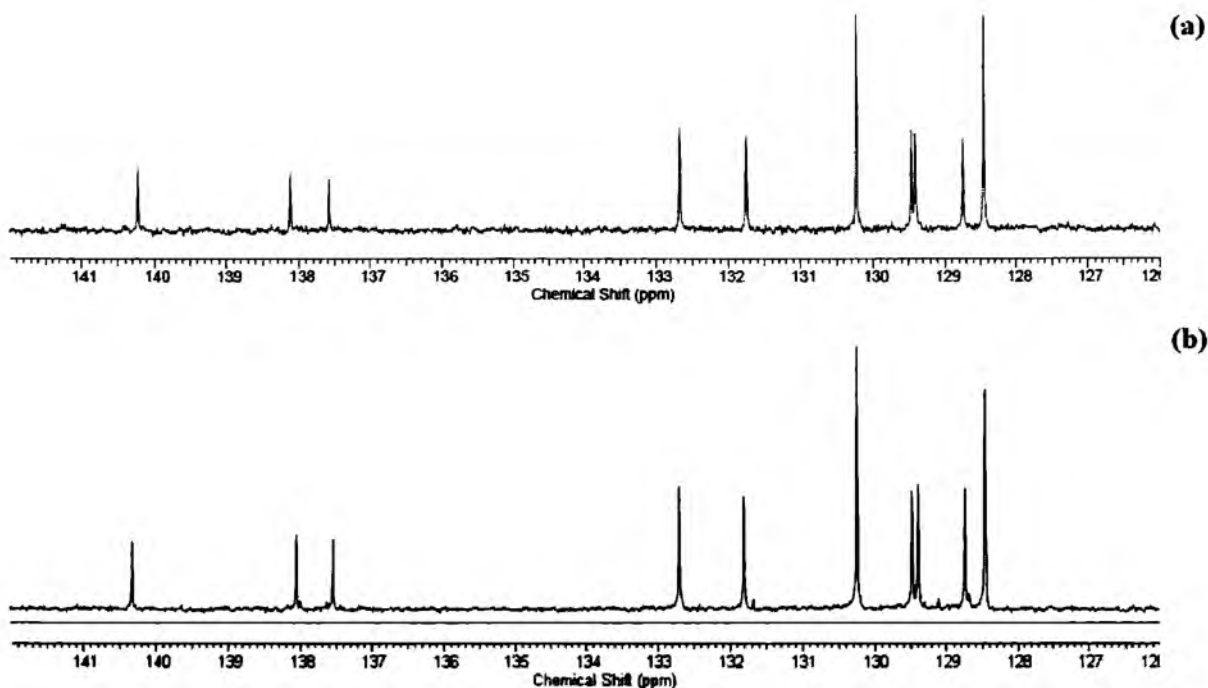
Rys. 94. (a) Wzór strukturalny formy monomerycznej ketoprofenu oraz (b) prawdopodobna struktura polikondensatu powstałego z ketoprofenu [246].

Z porównania widm w zakresie alifatycznym wynika, iż w sąsiedztwie sygnału pochodzącego od grupy metylowej świeżej próbki (18,26 ppm) w widmie postarzałej próbki pojawiają się dwa dodatkowe sygnały przy 18,61 i 18,81 ppm (Rys. 95b). Prawdopodobnie pochodzą one od analogicznych grup metylowych w poszczególnych jednostkach skondensowanego ketoprofenu. Natomiast sygnałowi przy 45,31 ppm pochodzącemu od węgla metinowego świeżej próbki w widmie postarzałej próbki towarzyszy niewielki sygnał przy 45,55 ppm, który można przypisać grupom na końcach łańcucha kondensatu. Sygnały przy 68,03 i 68,51 ppm nieobecne w widmie świeżej próbki prawdopodobnie pochodzą od czwartorzędowych atomów węgla, usytuowanych w głównych łańcuchach kondensatu i biorących udział w tworzeniu wiązań między poszczególnymi jednostkami monomerycznymi.



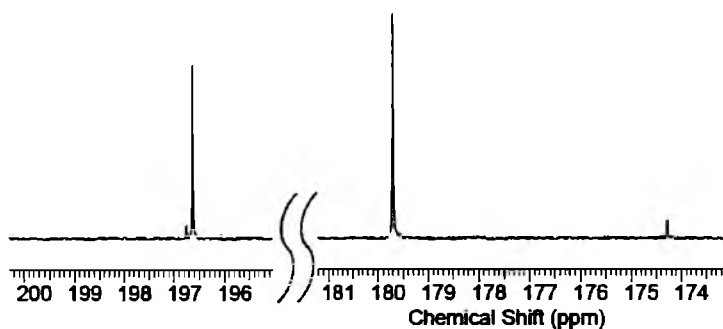
Rys. 95. Zakres alifatyczny widma ^{13}C NMR, zarejestrowanego dla *S*-(+)-ketoprofenu rozpuszczonego w zdeuterowanym chloroformie (CDCl_3); (a) roztwór świeżo sporządzony i (b) przechowywany przez okres jednego roku w roztworze etanolowo-wodnym [246].

Z porównania widm w zakresie aromatycznym wynika, że w tym pochodzącym od próbki postarzałej (Rys. 96b) pojawiają się dwa mało intensywne sygnały przy 129,09 i 131,65 ppm, które prawdopodobnie pochodzą odpowiednio od drugiego i szóstego atomu węgla aromatycznego, występujących w kolejnych jednostkach skondensowanego ketoprofenu.



Rys. 96. Zakres aromatyczny widma ^{13}C NMR, zarejestrowanego dla *S*-(+)-ketoprofenu rozpuszczonego w zdeuterowanym chloroformie (CDCl_3); (a) roztwór świeżo sporządzony i (b) przechowywany przez okres jednego roku w roztworze etanolowo-wodnym [246].

Widmo w zakresie karbonylowym próbki postarzałej (Rys. 97), w odróżnieniu od próbki świeżej, jest wzbogacone o dwa sygnały przy 174,29 i 196,76 ppm towarzyszące sygnałowi pochodzącemu od grupy karbonylowej (179,68 ppm).



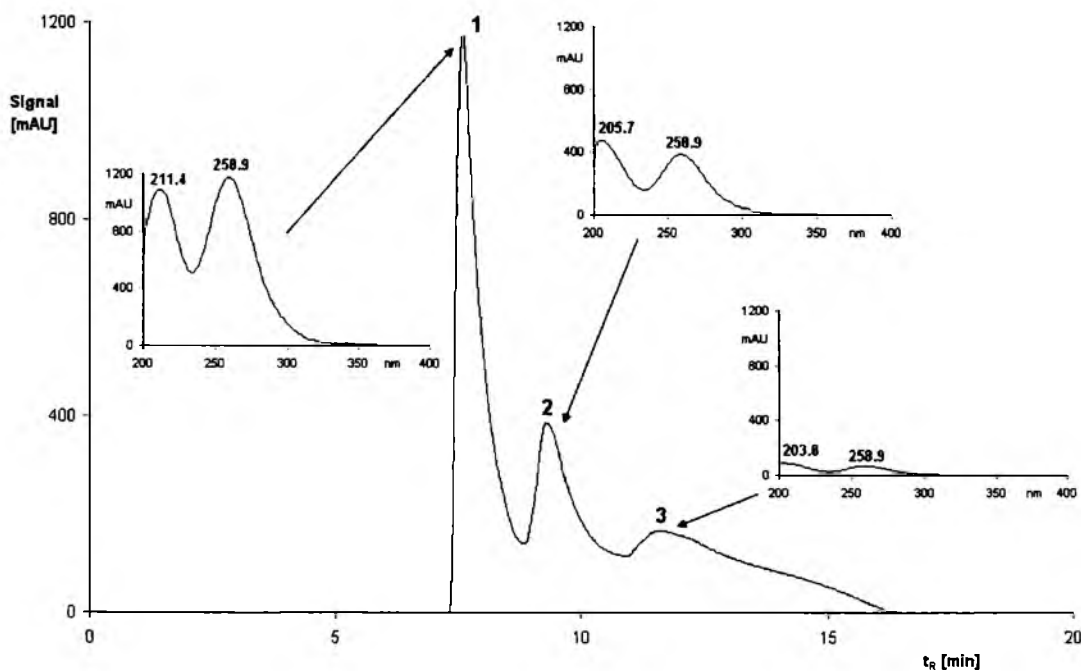
Rys. 97. Zakres karbonylowy widma ^{13}C NMR, zarejestrowanego dla *S*-(+)-ketoprofenu rozpuszczonego w zdeuterowanym chloroformie (CDCl_3), po jednym roku przechowywania w roztworze etanolowo-wodnym [246].

Badania przeprowadzone techniką spektroskopii ^{13}C NMR w pełni potwierdzają wyniki pochodzące z chromatografii cienkowarstwowej, a świadczące o tym, że ketoprofen łatwo ulega samorzutnej polikondensacji.

7.4.4.4. Achiralna wysokosprawna chromatografia cieczowa

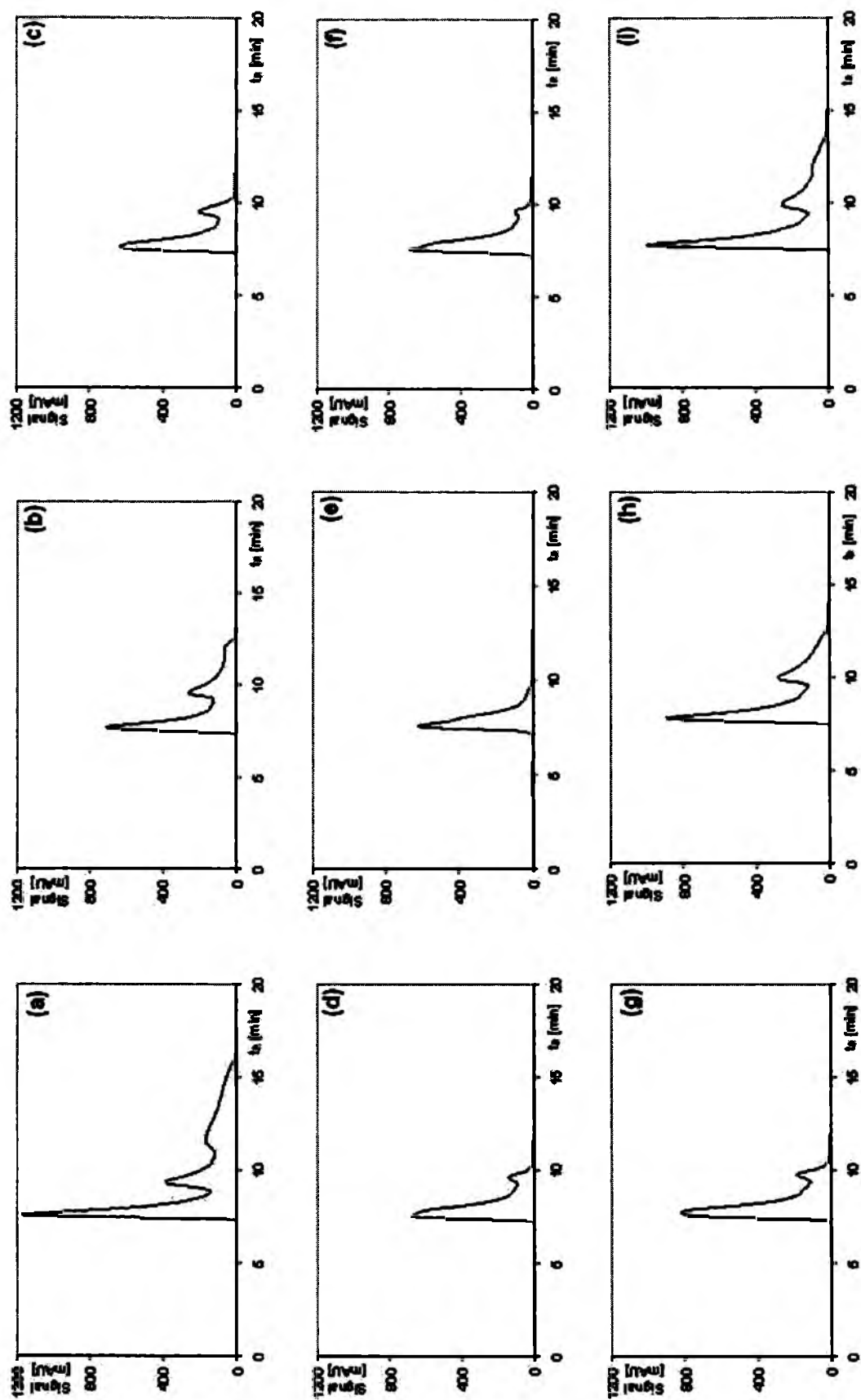
Analogicznie do α -fenyloglicyny i kwasu migdałowego, postanowiono prześledzić dynamikę procesu polikondensacji ketoprofenu przy pomocy achiralnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją na matrycy fotodiodowej (HPLC-DAD) i achiralnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (LC-MS). W eksperymencie z wykorzystaniem wymienionych technik śledzono pojawianie się i zmiany stężenia określonych indywiduów chemicznych podczas procesu starzenia się roztworu *S*-(+)-ketoprofenu w acetonitrylu, przechowywanego przez okres ośmiu dni.

Na Rys. 98 przedstawiono chromatogram zarejestrowany dla świeżo sporządzonego roztworu *S*-(+)-ketoprofenu w acetonitrylu. Prócz dominującego pik 1, o czasie retencji $t_R=7,66$ min, widoczne są dwa dodatkowe piki 2 i 3 o mniejszej intensywności i o czasach retencji równych odpowiednio 9,68 i 11,80 minut. Bardzo prawdopodobne jest, iż pochodzą one od produktów kondensacji ketoprofenu, podczas gdy pik 1 pochodzi od substancji wyjściowej. Widma UV widoczne na Rys. 98, zarejestrowane dla maksimów odpowiednich pików, różnią się jedynie intensywnością. Wynikać to może z takiej zależności, że im większa masa cząsteczkowa kondensatu, tym mniejsza jest wydajność jego tworzenia.



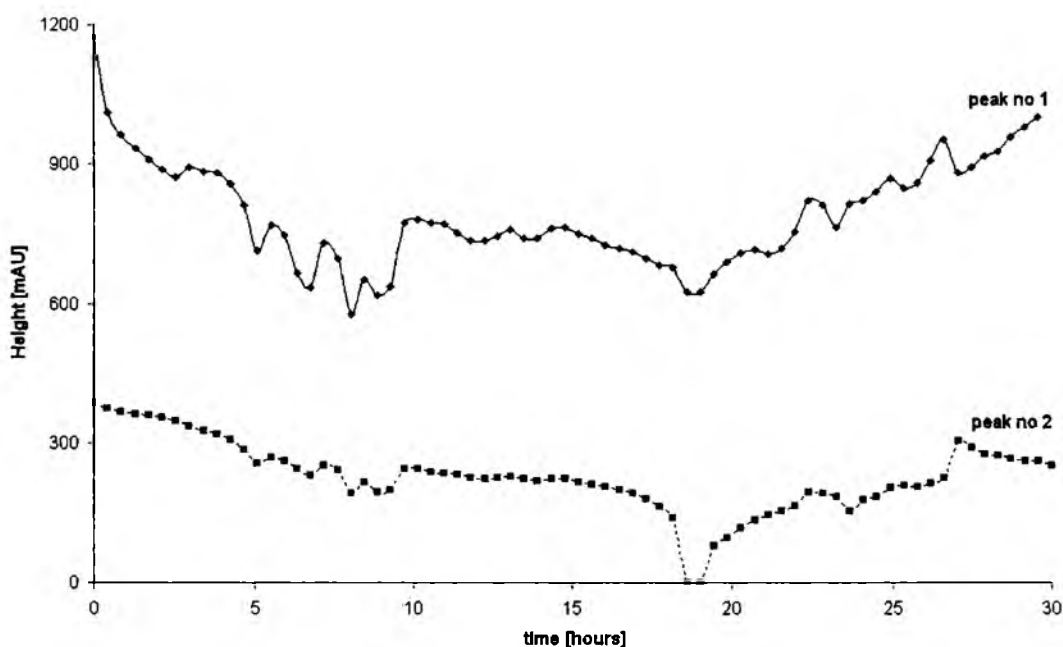
Rys. 98. Chromatogram *S*-(+)-ketoprofenu świeżo rozpuszczonego w acetonitrylu, zarejestrowany przy długości fali 259 nm. Na chromatogramie dodatkowo zamieszczono widma UV zarejestrowane dla wskazanych pików [250].

W czasie 30-godzinnego przechowywania *S*-(+)-ketoprofenu w acetonitrylu i rejestrowania w odstępach 25-minutowych odpowiednich chromatogramów, liczba pików chromatograficznych ulegała okresowym zmianom, co pokazano na Rys. 99 w postaci sekwencji dziewięciu chromatogramów. Przez pierwszych kilka godzin przechowywania próbki (Rys. 99a i b) na chromatogramach widoczne są 3 piki pokazane już na Rys. 98, jednak po około 10 godzinach liczba ta ulega zmniejszeniu do dwóch (Rys. 99c i d), a zanika pik 3. Po następnych 8 godzinach również pik 2 zanika (Rys. 99e), ale pojawia się on znów w 19 godzinie trwania eksperymentu (Rys. 99f, g, h). W ostatniej godzinie na chromatogramie znów pojawia się pik 3 (Rys. 99i), a wynik jest analogiczny do chromatogramu próbki świeżej (Rys. 98 i 99a). Oczywiście pik 1 jest widoczny na wszystkich chromatogramach rejestrowanych podczas trwania eksperymentu. Obserwowane zmiany na kolejnych chromatogramach mają nieregularną, aczkolwiek oscylacyjną naturę. Bardzo prawdopodobne, że wynikają one z okresowej zmiany stężenia polikondensatów w próbce *S*-(+)-ketoprofenu, której przyczyną jest powstawanie i rozpadanie się kondensatów powstałych z ketoprofenu, a prezentowanych na chromatogramach przez piki 2 i 3.



Rys. 99. Sekwencja dziewięciu chromatograficznych profili stężeniowych S-(+)-ketoprofenu rozpuszczonego w acetonitrylu zarejestrowanych przy długości fali 259 nm po (a) 0 h, (b) 5,5 h, (c) 9,5 h, (d) 18 h, (e) 20 h (g) 24,5 h, (h) 28 h i (i) 30 h przechowywania w temperaturze $22\pm1^{\circ}\text{C}$ [250].

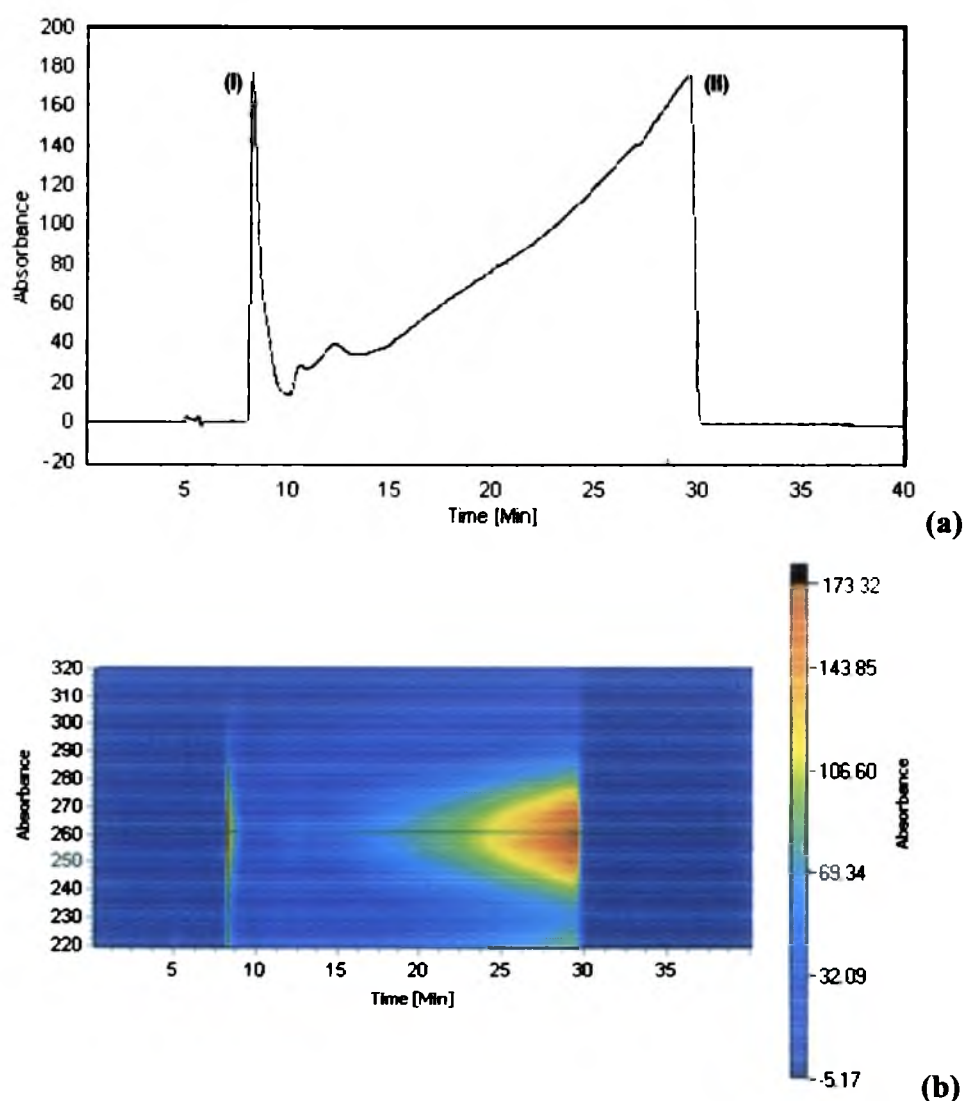
Kolejno starano się stwierdzić, czy wzrost stężenia produktów kondensacji zachodzi w sposób monotoniczny, czy też oscylacyjny. W tym celu sporządzono wykresy zmian wysokości pików, pochodzących najprawdopodobniej od monomeru (pik 1) i kondensatu o mniejszej masie cząsteczkowej (pik 2), na chromatogramach zarejestrowanych przy długości fali 259 nm. Wysokości te są proporcjonalne do odpowiednich stężeń przypisywanych im indywiduów. Na Rys. 100 przedstawiono zmiany wysokości pików 1 i 2 (numery jak na Rys. 98) w zależności od czasu przechowywania roztworu *S*-(+)-ketoprofenu. Wyraźnie widać, iż wysokości pików zmieniają się w sposób niemonotoniczny, co wskazuje na oscylacyjną naturę procesu kondensacji. Zrezygnowano z umieszczenia na tym wykresie krzywej dla pików 3 ze względu na to, iż pojawia się on na chromatogramach tylko na początku i na końcu eksperymentu, trwającego 30 godzin.



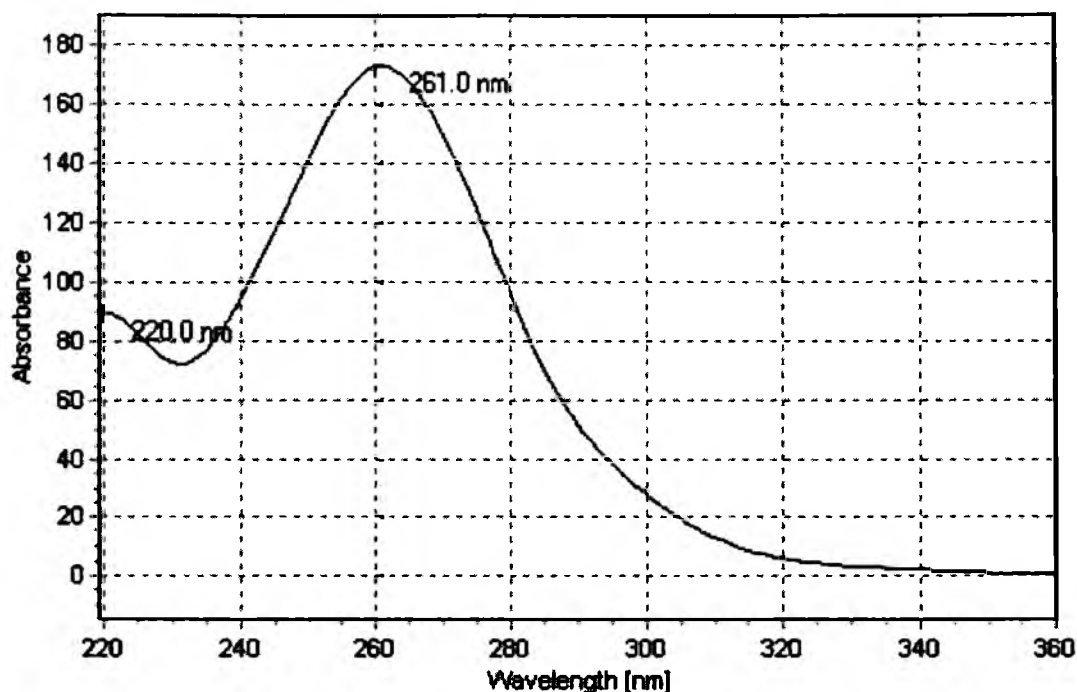
Rys. 100. Zmiany wysokości pików chromatograficznych 1 i 2 dla *S*-(+)-ketoprofenu rozpuszczonego w acetonitrylu i przechowywanego przez okres 30 godzin w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Oznaczenia pików jak na Rys. 98 [250].

Po ośmiu dniach od sporządzenia roztwór *S*-(+)-ketoprofenu w acetonitrylu ponownie poddano procesowi chromatografowania techniką HPLC-DAD. Różnice w czasach retencji między pomiarami w eksperymencie 30-godzinny i tym trwającym 8 dni wynikają z użycia różnych chromatografów i różnych kolumn o analogicznym wypełnieniu, jednak pochodzących z różnych firm produkcyjnych. Na chromatogramie (Rys. 101a) i spektrochromatogramie (Rys. 101b) widoczna jest większa ilość pików, niż tylko trzy

widocznie na chromatogramach z Rys. 98 i 99. Prócz pików oznaczonych jako I i II (Rys. 101a), z czasami retencji odpowiednio 8,28 i 28,45 minut, w zakresie czasu retencji od 10 do 15 minut pojawiają się dodatkowo cztery inne piki. Pik I ponownie może być przypisany materiałowi wyjściowemu, czyli *S*-(+)-ketoprofenowi, podobnie jak pik 1 obecny na Rys. 98 i 99. Natomiast anty-Langmuirowski kształt pików II, czyli z rozmytą częścią przednią (kształt taki charakteryzuje się rozproszonym frontem i ostrym ogonem), prawdopodobnie wskazuje na obecność w badanej próbce indywiduów chemicznych związanych oddziaływaniami międzycząsteczkowymi, być może poprzez wiązania wodorowe. Widmo UV, widoczne na Rys. 102, jest identyczne dla obu omawianych pików, co służy za poparcie hipotezy, iż pik II reprezentuje kondensat ketoprofenu.

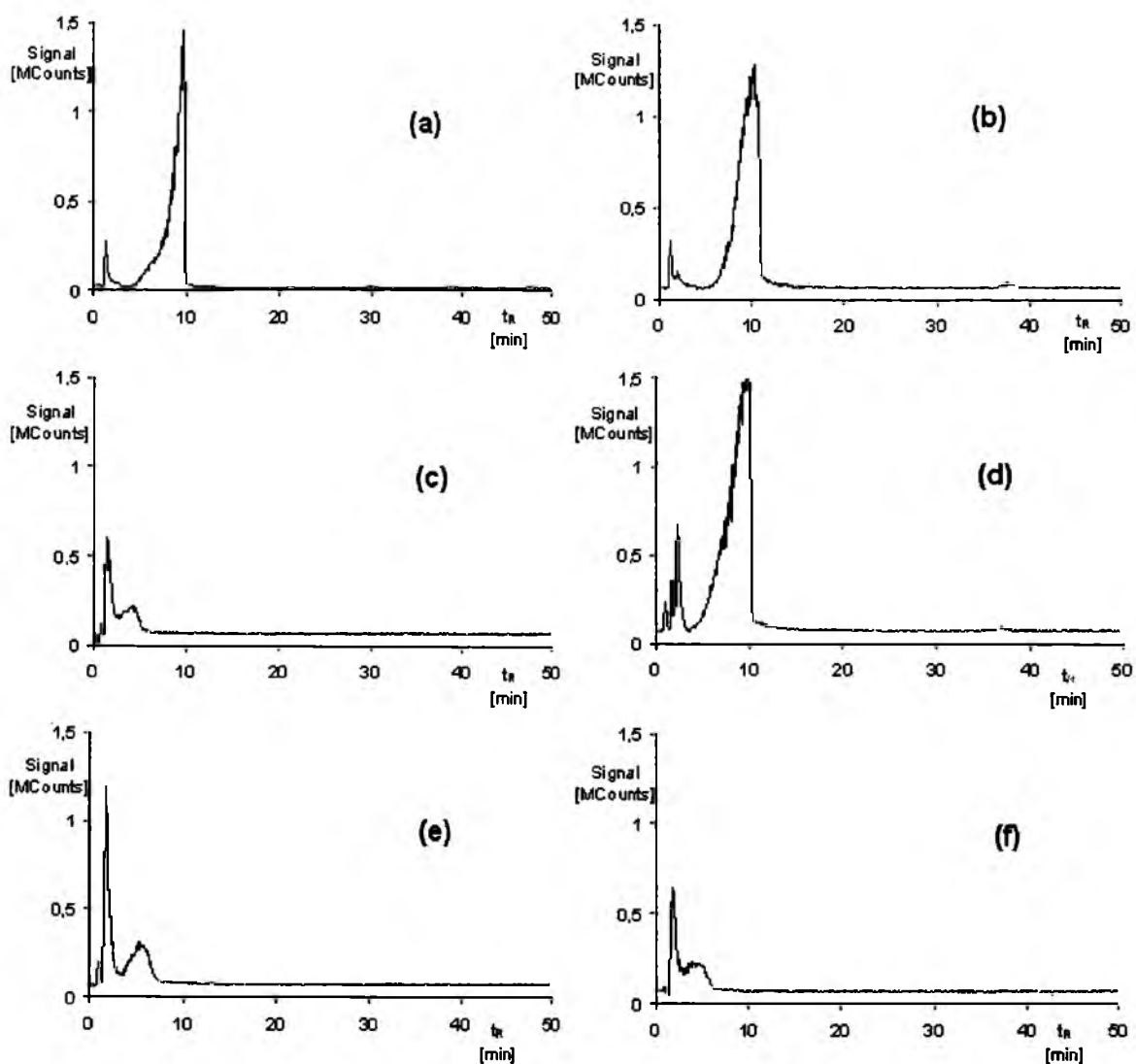


Rys. 101. (a) Chromatogram i **(b)** spektrochromatogram *S*-(+)-ketoprofenu rozpuszczonego w acetonitrylu zarejestrowane przy długości fali 257 nm dla próbki przechowywanej przez okres ośmiu dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ [250].



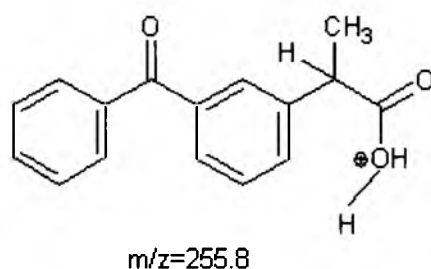
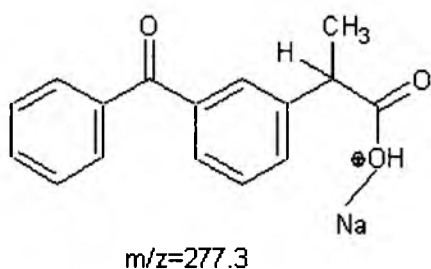
Rys. 102. Widmo UV zarejestrowane dla pików I i II obecnych na chromatogramie z Rys. 99a [250].

Eksperyment z użyciem techniki LC-MS trwał prawie 50 godzin. Ponownie prześledzono proces starzenia się *S*-(+)-ketoprofenu rozpuszczonego w acetonitrylu. W związku z tym, iż w przypadku technik HPLC-DAD i LC-MS zastosowano różne kolumny i różne warunki pracy, zarejestrowane chromatogramy również się różnią. Wyniki otrzymane techniką LC-MS są pokazane na Rys. 103 i 104. Na pierwszym z nich ukazano sekwencję sześciu zmieniających się w czasie profili stężeniowych. Chromatogramy te można podzielić na dwa typy, które występują naprzemiennie. Typ pierwszy charakteryzuje kilka ostrych pików przy $t_R \approx 1$ min i jeden dominujący pik przy $t_R \approx 10$ min (Rys. 103a, b i d). Typ drugi cechuje obecność dominującego, ostrego pików przy $t_R \approx 1$ min i szerokiego pików przy $t_R \approx 5$ min (Rys. 103c, e i f). Z tego wynika, iż pik przy $t_R \approx 1$ min, występujący na każdym chromatogramie, prawdopodobnie pochodzi od *S*-(+)-ketoprofenu. Okresowe zmiany pozycji omawianych profili stężeniowych, jak również pojawianie się i zanikanie pików przy wyższych czasach retencji (5 i 10 minut), może być spowodowane tworzeniem się i rozpadaniem kondensatów ketoprofenu w starzejącym się roztworze. Przyrost stężenia kondensatów prawdopodobnie ilustrują chromatogramy pierwszego typu. Za taką hipotezą przemawia anty-Langmuirowski kształt pików przy $t_R \approx 10$ min, co sugeruje adsorpcję kondensatów asocjacyjnych przez fazę stacjonarną. Na chromatogramach drugiego typu wyraźnie widać, iż pik przy $t_R \approx 1$ min jest intensywniejszy, niż pik przy $t_R \approx 5$ min, którego czas retencji wskazuje na kondensat o mniejszej masie cząsteczkowej, niż ten reprezentowany przez pik przy $t_R \approx 10$ min.

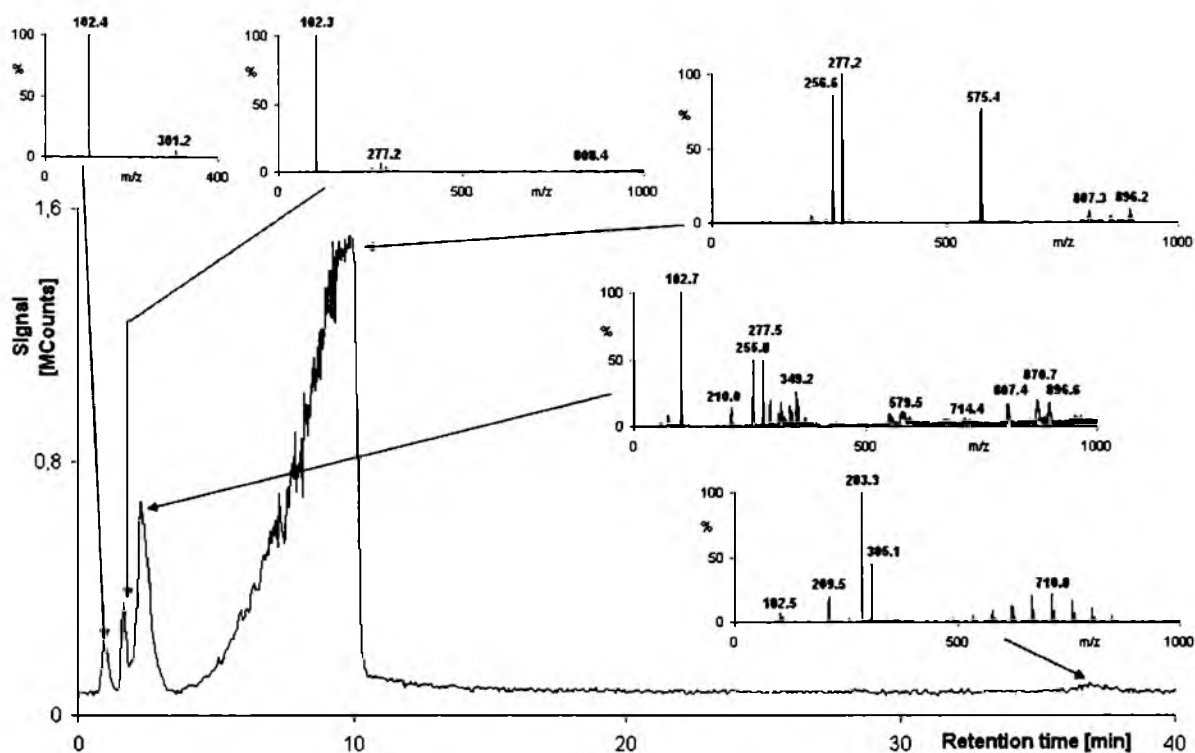


Rys. 103. Sekwencja sześciu chromatograficznych profili stężeniowych *S*-(+)-ketoprofenu rozpuszczonego w acetonitrylu, zarejestrowanych w systemie LC-MS po (a) 0 h, (b) 24 h, (c) 43,5 h, (d) 44,5 h, (e) 45,5 h i (f) 47,5 h okresie przechowywania w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

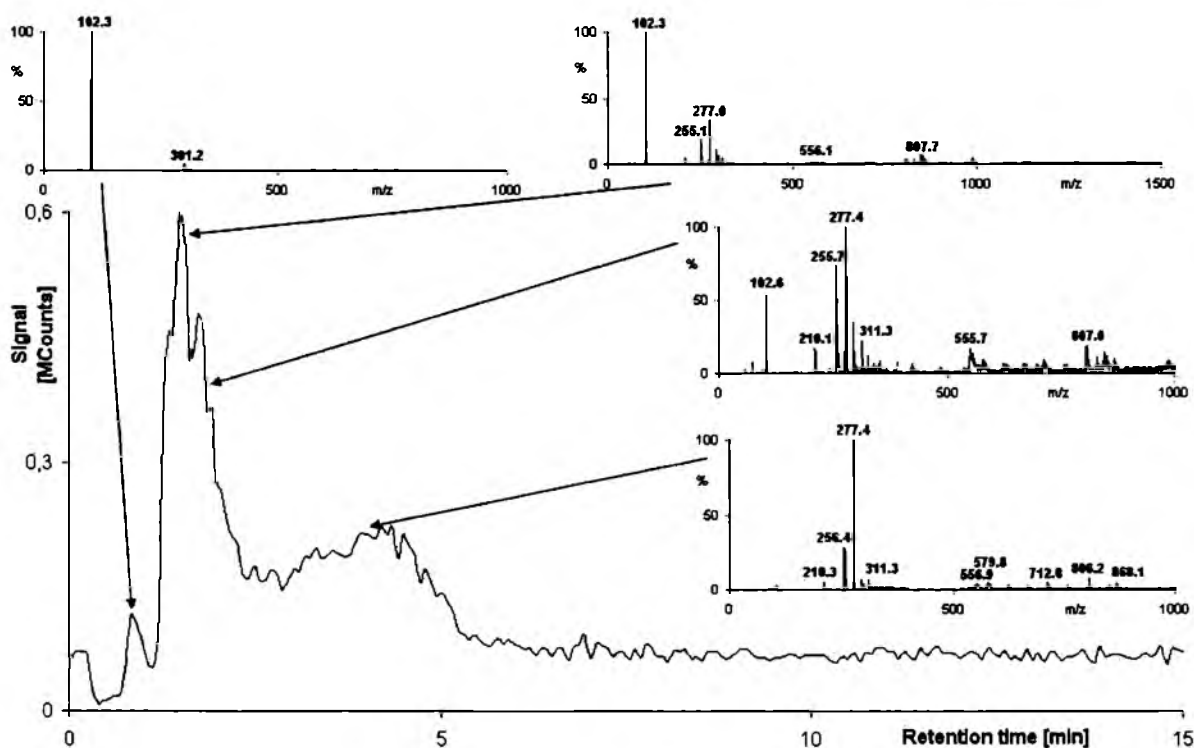
Na Rys. 104 pokazano chromatogramy zarejestrowane po 43,5 i 44,5 godzinach eksperymentu wraz z widmami masowymi dla każdego z pików. Pierwszy z tych chromatogramów należy do wcześniej omówionego typu drugiego (Rys. 104b), a drugi chromatogram odzwierciedla typ pierwszy (Rys. 104a). W widmach masowych zarejestrowanych dla pików chromatograficznych o wyższych czasach retencji występują linie dla $m/z > 500$, prawdopodobnie pochodzące od kondensatów ketoprofenu złożonych z kilku jednostek monomerycznych, natomiast w tychże widmach najczęściej występują piki przy $m/z = 255,8$ i $277,3$, których prawdopodobne struktury zaprezentowano poniżej:



(a)

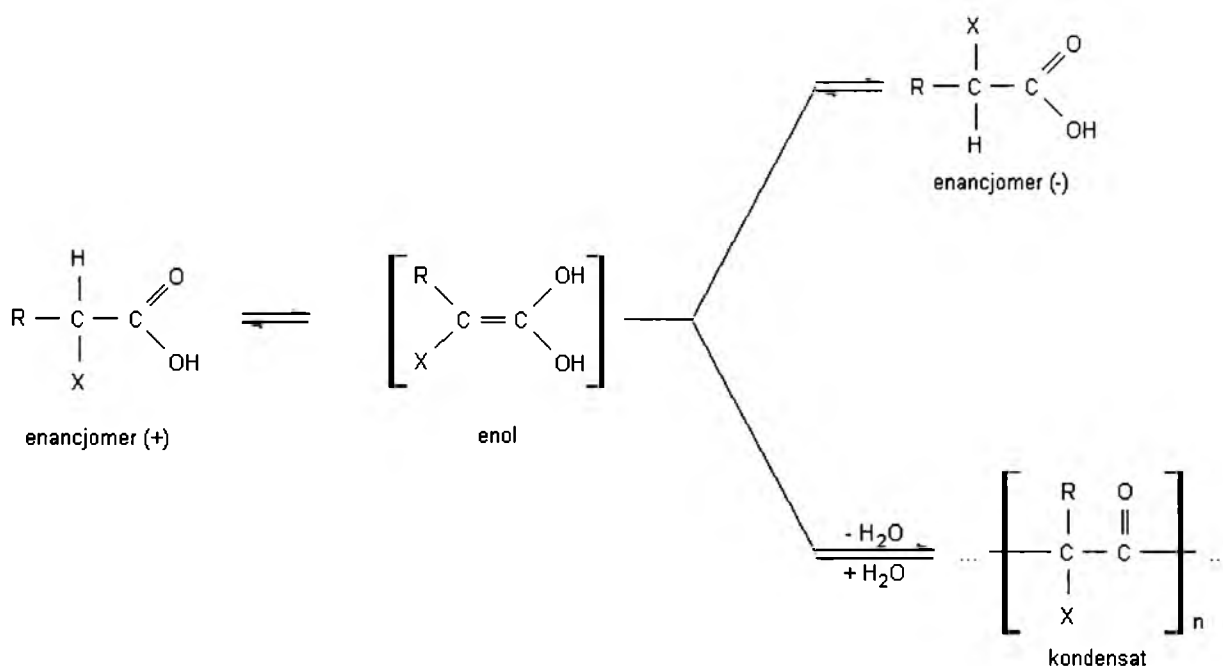


(b)



Rys. 104. Chromatogramy *S*-(+)-ketoprofenu rozpuszczonego w acetonitrylu zarejestrowanych w systemie LC-MS po (a) 44,5 h i (b) 43,5 h przechowywania w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Na chromatogramach dodatkowo zamieszczono widma masowe zarejestrowane dla wskazanych pików [250].

Przedstawione tutaj wyniki eksperymentu przemawiają (podobnie jak te otrzymane przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej i spektroskopii ^{13}C NMR) za tym, że ketoprofen w formie optycznie czystej, a także racemicznej, obok inwersji chiralnej może ulegać polikondensacji, co w rezultacie prowadzi do powstawania polikondensatów o różnej liczbie skondensowanych jednostek monomerycznych. Oba te procesy są ze sobą sprzężone, zachodząc w sposób niemonotoniczny, a nawet oscylacyjny. Najbardziej prawdopodobny mechanizm procesu chiralnej inwersji profenu prowadzi poprzez produkt pośredni – enol. Proces chiralnej inwersji można traktować jako równoległy do procesu polikondensacji, co dla ketprofenu w uproszczony sposób ilustruje Rys. 105.



Rys. 105. Ogólne przedstawienie procesu samorzutnej inwersji chiralnej oraz samorzutnej polikondensacji profenu, przebiegających w sposób równoległy (R to grupa metylowa, a X to podstawnik aryłowy) [231,250].

7.5. Modelowanie procesów oscylacyjnej inwersji chiralnej i oscylacyjnej kondensacji dla alifatycznych niskocząsteczkowych kwasów karboksylowych – model dwóch sprzężonych Templatorów

Poniżej zaprezentowano osiem stopniowo udoskonalanych modeli dwóch sprzężonych Templatorów, wykorzystywanych do symulacji zachodzenia procesów oscylacyjnej inwersji chiralnej i oscylacyjnej kondensacji dla alifatycznych niskocząsteczkowych kwasów karboksylowych. Podstawą tych modeli było zdefiniowanie odpowiedniego szablonu, który katalizowałby proces inwersji chiralnej pojedynczego wyjściowego kwasu karboksylowego. Jako odpowiednie szablony kolejno proponowano homodimery asocjacyjne poprzez wiązania wodorowe, wyższe asocjaty związane wiązaniami wodorowymi, kondensaty związane wiązaniami kowalencyjnymi oraz kombinacje asocjatów i kondensatów. Uzyskiwane w tych modelach oscylacyjne zmiany stężenia odpowiednich reagentów i towarzyszące im oscylacyjne zmiany nadmiaru enancjomerycznego w funkcji czasu były w sposób jakościowy porównywane z wynikami pomiarów chromatograficznych i polarymetrycznych.

Model dwóch sprzężonych Templatorów został opracowany przez prof. Irvinga. R. Epsteina z Brandeis University w Waltham, Massachusetts (USA) przy ścisłej współpracy z naszym ośrodkiem, polegającej na zapewnieniu odpowiednich wyników doświadczalnych, na dyskusji na możliwych strukturami supramolekularnymi i kowalencyjnie związanymi w postulowanych modelach asocjatów i kondensatów, a także na sugestjach dotyczących kinetyki proponowanych w modelach reakcji elementarnych.

7.5.1. Model z uwzględnieniem dimerów asocjacyjnych poprzez wiązani wodorowe bez członu dyfuzyjnego [251]

Oscylacyjne reakcje chemiczne są stosunkowo rzadkie, a wyjaśnienie cząsteczkowego mechanizmu tych procesów to duże wyzwanie. Poniżej przedstawiono podstawowy model oscylacyjnej transenancjomeryzacji chiralnego alifatycznego niskocząsteczkowego kwasu karboksylowego, z uwzględnieniem czasowo-przestrzennego przebiegu tego procesu.

Stechiometria oscylacyjnej transenancjomeryzacji chiralnego alifatycznego niskocząsteczkowego kwasu karboksylowego może być przedstawiona równaniem (26), które jednak nie uwzględnia kroków elementarnych:



Poniżej zaproponowano bardziej szczegółowy mechanizm w postaci szeregu elementarnych reakcji chemicznych, które, jak założono, odgrywają najbardziej znaczącą rolę w transeńcjomeryzacji rozpatrywanych kwasów karboksylowych:

Enolizacja



Dimeryzacja



Kataliza



gdzie: S i R to odpowiednie enancjomery S i R danego kwasu, E to odpowiedni enol, B to zasada, S₂ i R₂ to homodimery asocjacyjne odpowiednich enancjomerów S i R, połączone wiązaniami wodorowymi, SR to heterodimer asocjacyjny antymerów S i R, połączony wiązaniami wodorowymi, k oznacza stałe szybkości odpowiednich reakcji, a K to stałe równowagi tychże reakcji.

Pierwszy etap przedstawionego mechanizmu (tj. enolizacja) jest stechiometrycznym opisem powstawania enolu z antymerów S i R (odwracalne reakcje (27) i (28)).

Rozpatrywane chiralne kwasy karboksylowe oddziałują między sobą poprzez wiązania wodorowe. W nisko polarnych rozpuszczalnikach mają one tendencję do tworzenia cyklicznych dimerów, a w polarnych rozpuszczalnikach mogą tworzyć również mieszane

multimetry asocjacyjne. Dimeryzacja jako odrębny krok przedstawionego mechanizmu ((29)-(31)) przebiega równolegle do enolizacji.

Etap trzeci, przedstawiony reakcjami (32)-(35) i nazwany katalizą, decyduje o zachodzeniu inwersji chiralnej. Równania (32) i (33) wyrażają istotne założenie, że każdy homodimer, odgrywając rolę szablonu, katalizuje tworzenie odpowiadającego mu enancjomeru z cząsteczki enolu. W przypadku heterodimeru zakłada się, iż katalizuje on tworzenie z równym prawdopodobieństwem i w niestereospecyficzny sposób dowolnego enancjomeru (równania (34) i (35)).

W celu zaproponowania właściwych równań kinetycznych odpowiadających poszczególnym równaniom stechiometrycznym (27)-(35) powinno się znać przynajmniej rzędy wielkości każdej ze stałych szybkości, co jest praktycznie niemożliwe do pozyskania na drodze doświadczalnej. Zamiast tego skupiono się na jakościowym zachowaniu rozpatrywanych układów na etapie katalizy, jeszcze bardziej go upraszczając przy użyciu modelu oscylatora zwanego Templatorem [252,253].

Model Templatora stara się odzwierciedlić istotne elementy dynamicznego zachowania samopowielającego się układu w trzech krokach elementarnych [254]:



gdzie: A_0 i A określają monomer odpowiednio przed i po wprowadzeniu do układu, B określa dimer utworzony z monomeru, a P określa nieaktywny produkt powstały z dimeru. Wielkości k_0 , k_1 i k_2 są odpowiednio stałymi szybkości reakcji (36), (37) i (38). Ponadto $a_0=[A_0]$, $a=[A]$, $b=[B]$, $K=k_0/k_1$.

Monomer A wpływa w sposób ciągły do układu (36) i ulega dimeryzacji tworząc dimer B , który jest następnie szablonem dla powielania samego siebie (37). Ostatecznie B jest katalitycznie przekształcany w nieaktywny produkt P (38). Tak więc równanie (36) może odzwierciedlać transport monomerów przez granicę między fazami, z kolei równanie (38) reprezentuje prawdopodobną adsorpcję dimerów na granicy faz lub na szklanej powierzchni pojemnika, w którym się znajduje.

Reakcje (36)-(38) stanowią daleko idące uproszczenie modelu danego równaniami (27)-(35), ale zawierają najbardziej istotne cechy możliwej transformacji strukturalnej katalizowanej homodimerami, a to dzięki tylko dwom substancjom, A i B, których stężenia powinny być śledzone, można je symulować i analizować ich dynamikę. Dodatkowym założeniem uproszczonego modelu danego równaniami (36)-(38) jest to, że wyjściowy chiralny niskocząsteczkowy kwas karboksylowy może ulegać samorzutnej inwersji chiralnej, co jest dane równaniem:



Powstały w wyniku reakcji (39) antymer może ulegać analogicznym reakcjom, jak te dane równaniami (36)-(38). W ten sposób dla powstałego antymeru został zaproponowany model drugiego Templatora:



gdzie: A'_0 i A' określają monomer drugiego antymeru odpowiednio przed i po wprowadzeniu do układu, B' określa dimer utworzony z monomeru A' , a P' określa nieaktywny produkt powstały z dimeru B' . Wielkości k_0 , k_1 i k_2 są odpowiednio stałymi szybkości reakcji (40), (41) i (42). Ponadto $a'_0=[A'_0]$, $a'=[A']$, $b'=[B']$, $K=k_0/k_1$.

Równania kinetyczne dla sprzężonego układu dwóch Templatorów przedstawiają się następująco:

$$\frac{da}{dt} = k_0a_0 - 2k_1a^2b + k_r(a'-a) \quad (43)$$

$$\frac{db}{dt} = k_1a^2b - \frac{k_2b}{b+K} \quad (44)$$

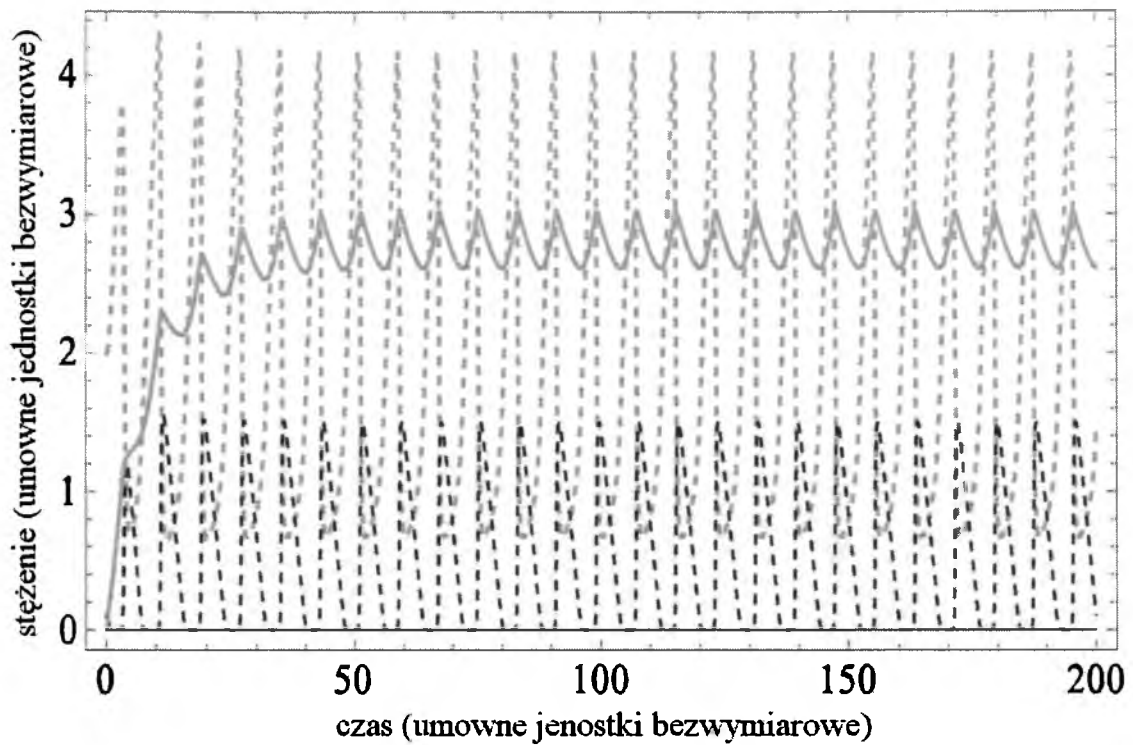
$$\frac{da'}{dt} = k_0a'_0 - 2k_1a'^2b' - k_r(a'-a) \quad (45)$$

$$\frac{db'}{dt} = k_1a'^2b' - \frac{k_2b'}{b'+K} \quad (46)$$

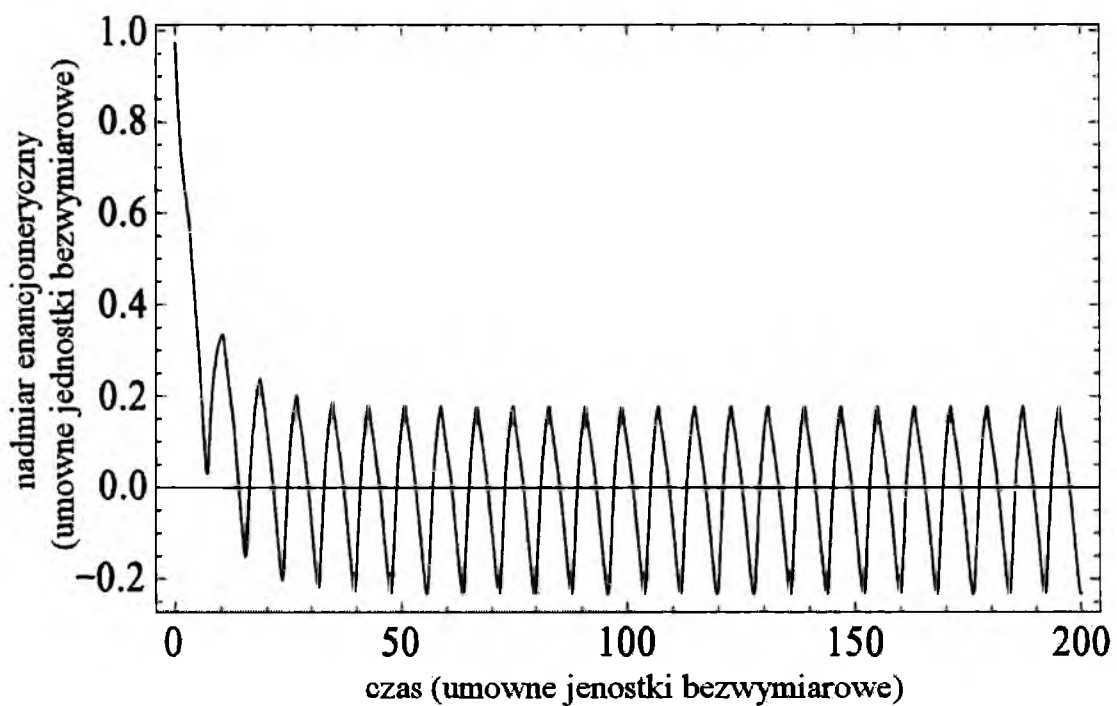
Ponieważ w prezentowanym modelu głównie chodzi o jakościowe zachowanie się rozpatrywanych kwasów karboksylowych, do przeprowadzonych symulacji wybrano prosty zestaw wartości liczbowych parametrów fizykochemicznych: $k_0a_0=1$, $k_1=1$, $k_2=1$, $k_r=0,1$ i $K=0,1$ w celu prześledzenia zachowania się układu przy różnych wartościach $k_0a'_0$. Przeskalowanie parametrów lub, równoważnie, wybór odpowiednich jednostek dla czasu i stężenia umożliwiłby przypisanie rzeczywistych wartości konkretnym wielkościom stężeń i nadmiaru enancjomerycznego bez zmiany jakościowego zachowania rozpatrywanego układu. Równania (43)-(46) scałkowano przy użyciu programu Matlab i otrzymano oscylacyjne zmiany odpowiednich stężeń i nadmiaru enancjomerycznego dla szerokiego zakresu wartości parametrów kinetycznych. Nadmiar enancjomeryczny (e.e.) zdefiniowano jako iloraz różnicy stężeń antymeru S i antymeru R względem sumy stężeń obu rozpatrywanych antymerów:

$$e.e. = \frac{(a + 2b - a' - 2b')}{(a + 2b + a' + 2b')} \quad (47)$$

Na Rys. 106 i 107 przedstawiono wyniki otrzymane dla dwóch różnych wartości $k_0a'_0$. Stosunek a'_0/a_0 wskazuje na ułamek zanieczyszczeń obecny w komercyjnym związku wyjściowym, określonym przez producenta jako czysty optycznie. W obu przypadkach zaobserwować można okresowe zmiany wartości stężeń i nadmiaru enancjomerycznego po krótkim początkowym stanie przejściowym, a znak nadmiaru enancjomerycznego oscyluje od wartości dodatnich do ujemnych. Dla większej zawartości zanieczyszczeń (Rys. 107) zachowanie układu jest bardziej złożone, a krzywe zmian wykazują kilka maksimów i minimów w jednym cyklu, co dobrze koreluje z nieregularną zmianą stężeń w przypadku profenów [129-131,227,240]. Przy wyborze innych wartości dla uwzględnianych parametrów kinetycznych, układ może ulegać zmianom monotonicznym lub oscylować w taki sposób, że nadmiar enancjomeryczny nie będzie zmieniał znaku.

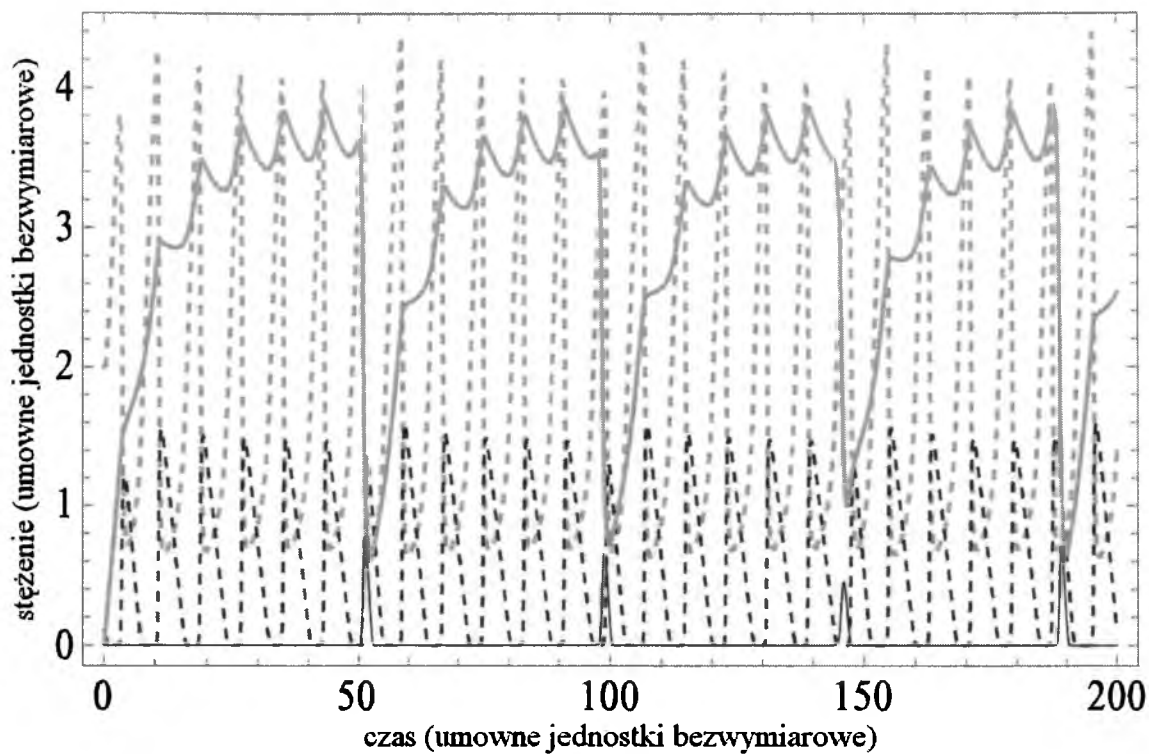


(a)

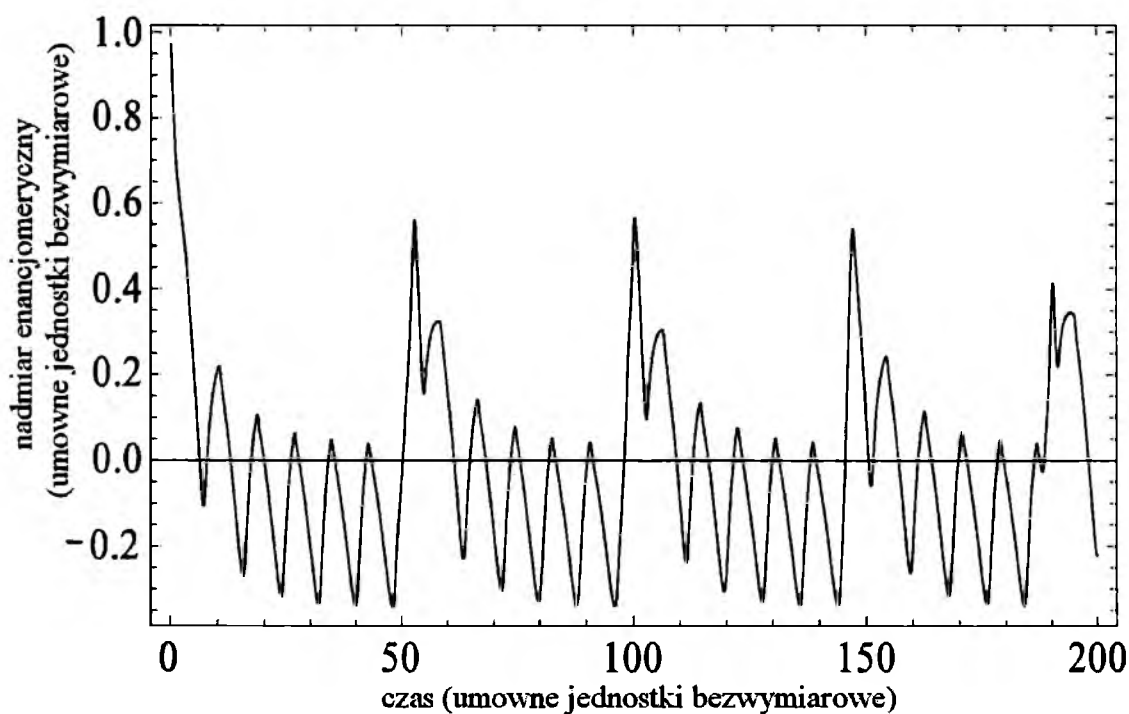


(b)

Rys. 106. Symulacja zmian wartości (a) stężenia i (b) nadmiaru enancjomerycznego w czasie na podstawie równań (43)–(46) dla $k_0 a'_0 = 0,1$. Warunki początkowe: $a_0 = 2$, $b_0 = 0,1$, $a'_0 = 0,01$ i $b'_0 = 0,01$; a – szara przerywana linia, b – szara ciągła linia, a' – czarna przerywana linia, b' – czarna ciągła linia [251].



(a)



(b)

Rys. 107. Symulacja zmian wartości (a) stężenia i (b) nadmiaru enancjomerycznego w czasie na podstawie równań (43)-(46) dla $k_0 a'_0 = 0,2$. Warunki początkowe: $a_0 = 2$, $b_0 = 0,1$, $a'_0 = 0,01$ i $b'_0 = 0,01$; a – szara przerywana linia, b – szara ciągła linia, a' – czarna przerywana linia, b' – czarna ciągła linia [251].

7.5.2. Model z uwzględnieniem dimerów asocjacyjnych poprzez wiązania wodorowe z jednowymiarowym członem dyfuzyjnym [251]

Następnie rozwinięto model dwóch sprzężonych Templatorów w taki sposób, aby móc śledzić czasoprzestrzenne zmiany odpowiednich wielkości. W tym celu do równań (43)-(46) dodano człony dyfuzyjne dla układu linowego (jednowymiarowego) o długości $x=10$. Przyjęto, że dla A i A' współczynniki dyfuzji są jednakowe, a współczynniki dyfuzji dla form dimerycznych są znacząco mniejsze, niż dla form monomerycznych, co jest warunkiem koniecznym, chociaż niewystarczającym dla uzyskania struktur Turinga [255]. Otrzymane równania mają postać:

$$\frac{da}{dt} = k_0 a_0 - 2k_1 a^2 b + k_r (a' - a) + D_A \frac{d^2 a}{dx^2} \quad (48)$$

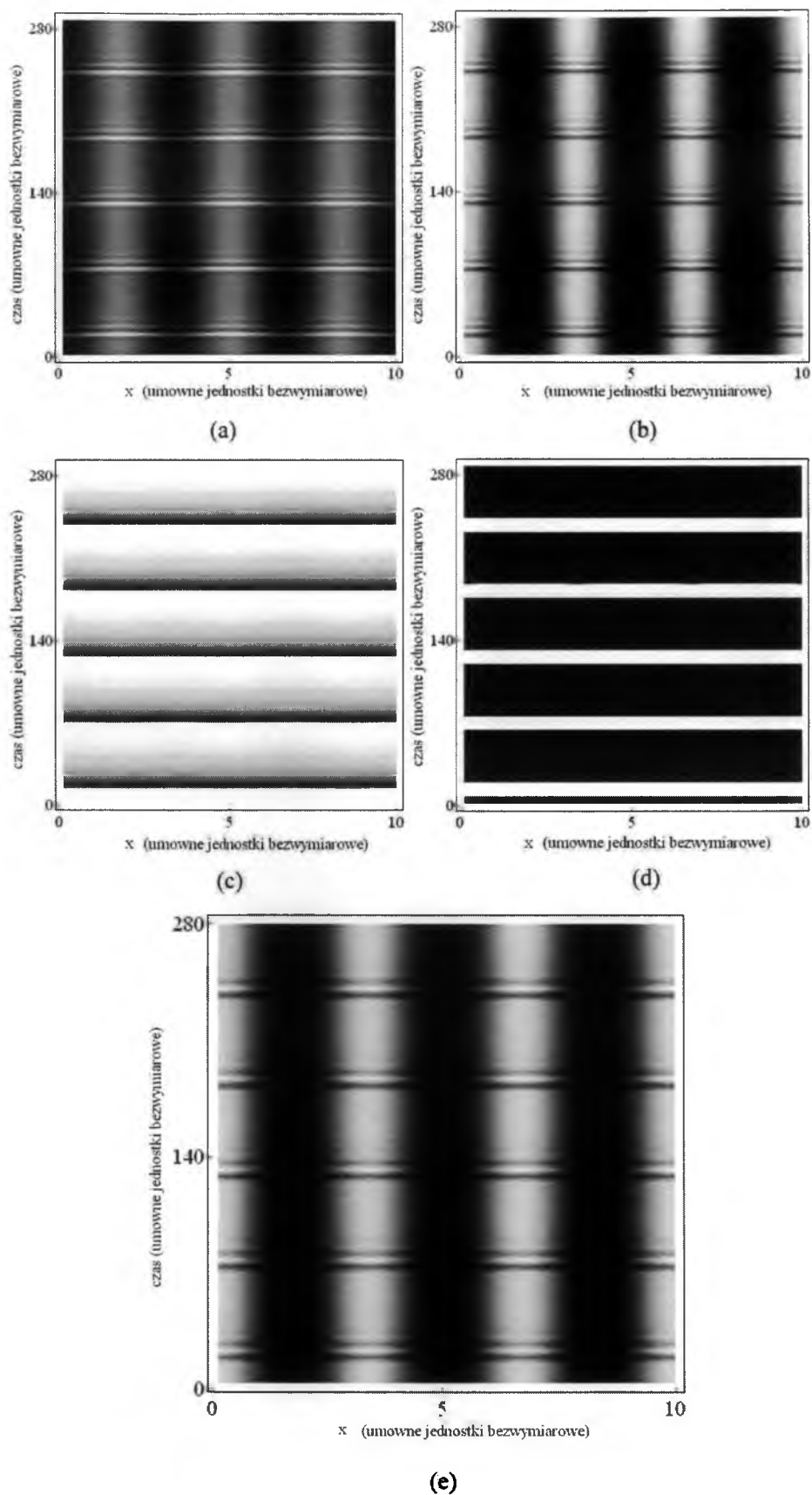
$$\frac{db}{dt} = k_1 a^2 b - \frac{k_2 b}{b + K} + D_B \frac{d^2 b}{dx^2} \quad (49)$$

$$\frac{da'}{dt} = k_0 a'_0 - 2k_1 a'^2 b' - k_r (a' - a) + D_{A'} \frac{d^2 a'}{dx^2} \quad (50)$$

$$\frac{db'}{dt} = k_1 a'^2 b' - \frac{k_2 b'}{b' + K} + D_{B'} \frac{d^2 b'}{dx^2} \quad (51)$$

gdzie: D_A i $D_{A'}$ – współczynniki dyfuzji antymerów S i R w postaci monomerycznej, D_B i $D_{B'}$ – współczynniki dyfuzji homodimerów asocjacyjnych odpowiednio antymerów S i R.

Zaczynając od parametrów wyjściowych i od homogenicznych warunków początkowych odpowiadających Rys. 107, losowo w niewielkim stopniu zaburzono stężenie A i śledzono jego zmiany w czasie i przestrzeni. Równania (48)-(51) scałkowano przy użyciu programu Matlab, a uzyskane wyniki zaprezentowano na Rys. 108 w postaci wykresów czasowo-przestrzennych. Patrząc zgodnie z osią poziomą na Rys. 108a i b, można dostrzec wyraźną strukturę przestrzenną dla antymeru S, o obszarach wysokich wartości a i małych b naprzemian z obszarami małych wartości a i wysokich wartości b. Wzdłuż osi pionowej również obserwuje się powtarzalność czasową. Interesujące jest to, że stężenia a' i b' są prawie homogenicznie rozmieszczone w przestrzeni, jednak oscylują okresowo w czasie (Rys. 108c i d). Wykres związany z nadmiarem enancjomerycznym (e.e.) zasadniczo odzwierciedla strukturę profilu stężeniowego B.



Rys. 108. Wykresy zmian przestrzenno-czasowych powstałe na podstawie równań (48)–(51) wykonane dla (a) a, (b) b, (c) a', (d) b', (e) e.e. Współczynniki dyfuzji wynoszą $D_A=D_{A'}=1$ i $D_B=D_{B'}=0,125$. Warunki początkowe jak dla Rys. 107. Białe pola odpowiadają wysokiemu stężeniu, a czarne – niskiemu stężeniu [251].

7.5.3. Model z uwzględnieniem dimerów asocjacyjnych poprzez wiązania wodorowe z dwuwymiarowym członem dyfuzyjnym [247]

W celu śledzenia czasoprzestrzennego zachowania rozpatrywanego układu, do równań (43)-(46) dodano dwuwymiarowy człon dyfuzyjny. W ten sposób otrzymano cząstkowe równania różniczkowe (52)-(55), które opisują zachowanie się A, B, A' i B' w jednej warstwie prezentowanego układu. Założono przy tym, iż monomery rozpraszają się szybciej, niż dimery. Fakt, że A, B, A' i B' są enancjomerami wymaga, aby wszystkie stałe szybkości były identyczne. Jednakże a_0 i a'_0 mogą być różne, ponieważ dwie warstwy mają różną zawartość enancjomerów. Końcowe równania mają postać:

$$\frac{da}{dt} = k_0 a_0 - 2k_1 a^2 b + k_r (a' - a) + D_A \left(\frac{d^2 a}{dx^2} + \frac{d^2 a}{dy^2} \right) \quad (52)$$

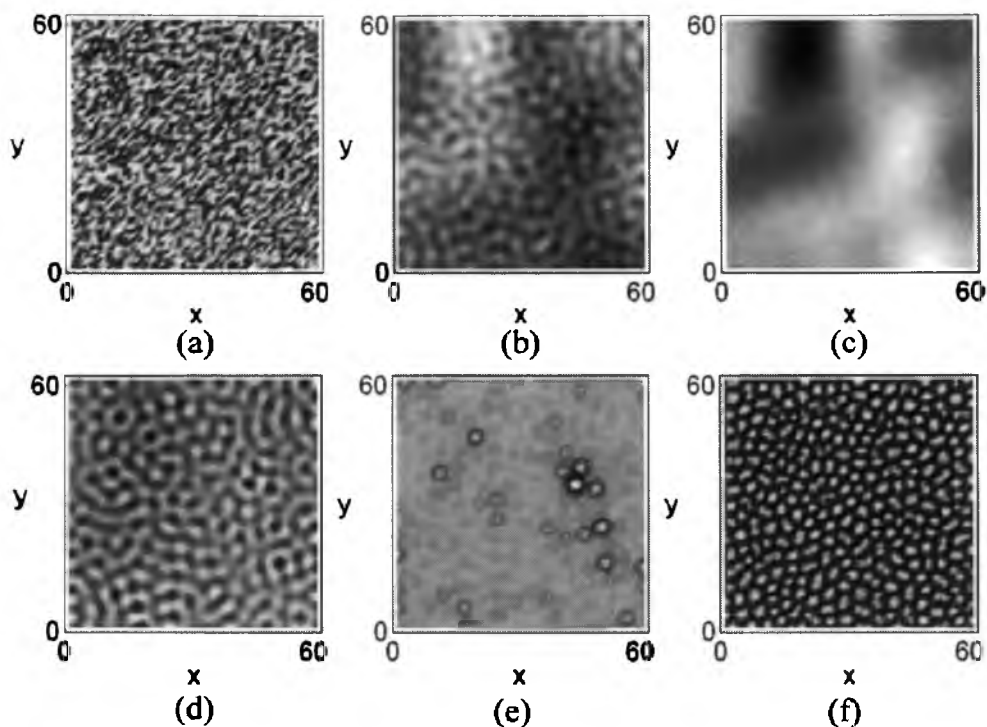
$$\frac{db}{dt} = k_1 a^2 b - \frac{k_2 b}{b + K} + D_B \left(\frac{d^2 b}{dx^2} + \frac{d^2 b}{dy^2} \right) \quad (53)$$

$$\frac{da'}{dt} = k_0 a'_0 - 2k_1 a'^2 b' - k_r (a' - a) + D_{A'} \left(\frac{d^2 a'}{dx^2} + \frac{d^2 a'}{dy^2} \right) \quad (54)$$

$$\frac{db'}{dt} = k_1 a'^2 b' - \frac{k_2 b'}{b' + K} + D_{B'} \left(\frac{d^2 b'}{dx^2} + \frac{d^2 b'}{dy^2} \right) \quad (55)$$

Wybrano zerową zmienność warunków granicznych i dodano niewielką losową zmienność stężenia A przy początkowych stałych stężeniach wszystkich parametrów wynoszących $a_0=2$, $b_0=0,1$, $a'_0=0,01$ i $b'_0=0,01$. Całkowanie równań (52)-(56) przy użyciu parametrów $k_0 a_0=1$, $k_0 a'_0=0,2$, $k_1=1$, $k_2=1$, $K=0,1$, $k_r=0,1$, $D_A=D_{A'}=1$, $D_B=D_{B'}=0,1$ na sieci o wymiarach $L_x=L_y=60$ prowadzi do otrzymania wyników zaprezentowanych na Rys. 109.

Liniowa analiza stabilności równań (52)-(56) pokazuje dla wyznaczonego stosunku stałych dyfuzji $D_B/D_A=D_{B'}/D_{A'}=0,1$, że homogeniczne oscylacje są stanem stacjonarnym układu, ale gdy początkowe zaburzenia są wystarczająco duże (Rys. 109a), wzrasta długi przestrzenny niehomogeniczny stan przejściowy (Rys. 108b-f), który ukazuje szczególne podobieństwo do niektórych wyników eksperymentalnych [255].



Rys. 109. Przestrzenne rozmieszczenie nadmiaru enancjomerycznego dla czasu równego (a) 0, (b) 17,5, (c) 24,5, (d) 46, (e) 64 i (f) 100 jednostek bezwymiarowych. Białe obszary odpowiadają $e.e. = -1$, a czarne $e.e. = 1$ [255].

Podsumowując, prezentowany tutaj model oscylacyjnej inwersji chiralnej alifatycznych niskocząsteczkowych kwasów karboksylowych zachodzącej *in vitro* w zasadniczy sposób uwzględnia zdolności tych związków do międzycząsteczkowych oddziaływań poprzez wiązania wodorowe, w wyniku czego tworzą się struktury supramolekularne cyklicznych dimerów i/lub liniowych multimetrów. Te właściwości strukturalne są istotne w procesie enancjoselektywnym, opierającym się na szablonach będących kluczową koncepcją proponowanego mechanizmu.

Model dwóch sprzężonych Templatorów odzwierciedla eksperymentalne obserwacje inwersji chiralnej w przypadku prostych kwasów karboksylowych, jednak nie proponuje żadnej rzeczywistej reakcji chemicznej lub procesu fizycznego odpowiedzialnego za oscylacyjne usuwanie reakcyjnego szablonu, będącego cyklicznym asocjacyjnym dimerem wyjściowego kwasu karboksylowego. Maksymalna prostota procesu homodimeryzacji kieruje naszą uwagę na przejściowy produkt reakcji (jon enolanowy lub enol) jako na przyczynę zachodzenia procesu nieliniowego, jednakże jak dotąd, żadna z reakcji oscylacyjnych, charakteryzująca się powstaniem takiego właśnie produktu przejściowego, nie została odkryta.

7.5.4. Model z uwzględnieniem dimerów i multimetrów asocjacyjnych poprzez wiązania wodorowe [228]

W prezentowanym poniżej modelu uwzględniono stężenia antymeru S, R i ich dimerów S₂ i R₂. Założono, iż reakcja dimeryzacji może przebiegać bez katalizy:



lub też może być katalizowana przez dimery (autokataliza):



Dla uproszczenia zaniedbano powstawanie heterodimerów, przy czym konieczne było założenie, iż ten proces jest znacznie powolniejszy, niż proces tworzenia się homodimerów.

Rozważono również zbiór oligomerów połączonych wiązaniami wodorowymi, które pełnią rolę swoistych buforów zdolnych do usuwania asocjacyjnych dimerów i wprowadzania monomerów do układu. Dimery mogą być usuwane dzięki tworzeniu się oligomerów R₅, S₅, Q i P:



Jeśli dla [R₅] zastosuje się przybliżenie stanu stacjonarnego i dodatkowo założy się, iż całkowite stężenia [R₃]+[R₂], [S₃]+[S₂] i [Q] są w przybliżeniu stałe, to szybkość usuwania dimerów nie jest liniowa, ale za to proporcjonalna do $\frac{k_2 b_2}{(1 + b_2)}$, gdzie b₂ oznacza [R₂].

Monomery są wprowadzane do układu ze zbiornika oligomerów z pomocą takich reakcji, jak:



Stałe szybkości reakcji (60a) i (60b) są niewielkie i stałe, ale różnią się między sobą, gdyż stężenia S i R są różne. Założono, że racemizacja jest prostą reakcją liniową:



Zestawowi równań stechiometrycznych (56)-(61) odpowiadają określone równania kinetyczne zaprezentowane poniżej:

$$\frac{da_1}{dt} = \in (k_{01} + k_1(b_1 - a_1^2) - 2a_1^2b_1 + k_3(a_2 + a_1)) \quad (62a)$$

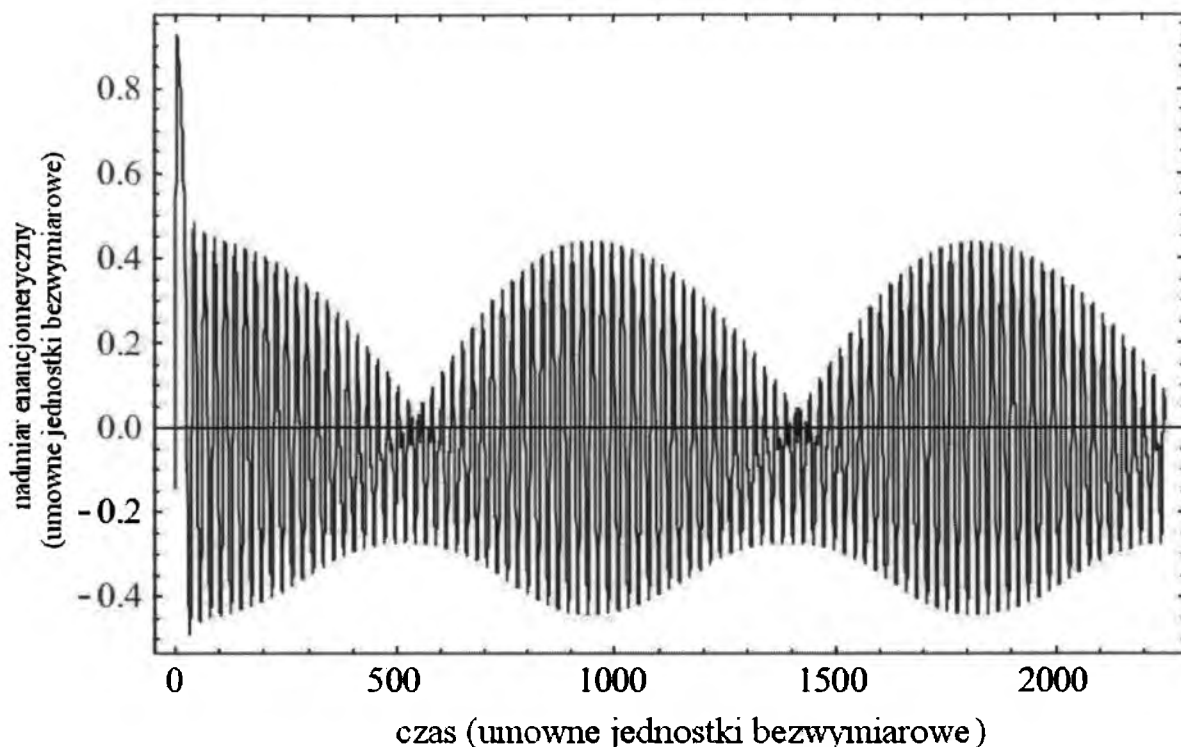
$$\frac{db_1}{dt} = a_1^2b_1 - k_1(b_1 + a_1^2) - \frac{k_2b_1}{1+b_1} \quad (62b)$$

$$\frac{da_2}{dt} = \in (k_{02} + k_1(b_2 - a_2^2) - 2a_2^2b_2 - k_3(a_2 - a_1)) \quad (63a)$$

$$\frac{db_2}{dt} = a_1^2b_1 - k_1(b_2 - a_2^2) - \frac{k_2b_2}{1+b_2} \quad (63b)$$

gdzie: a_1 , b_1 , a_2 i b_2 to bezwymiarowe stężenia odpowiednio S, S_2 , R i R_2 , a k_{01} , k_{02} , k_1 , k_2 i k_3 oznaczają bezwymiarowe stałe będące funkcjami stałych reakcji (56)-(61).

Zgodnie z tym modelem oscylacje pojawiają się w obu podukładach enancjomerycznych. Racemizacja jest liniową reakcją odwracalną związaną z dwoma oscylacyjnymi podukładami. W takim podukładzie obok prostych oscylacji występują też oscylacje pseudookresowe i mieszane, składające się z oscylacji o małych i dużych amplitudach. Zostało to zaprezentowane na Rys. 110, powstałym po scałkowaniu równań kinetycznych (62) i (63), a będącym zapisem zmian nadmiaru enancjomerycznego w czasie.



Rys. 110. Zmiany wartości nadmiaru enancjomerycznego ($e.e. = \frac{(a_1 - a_2 + 2b_1 - 2b_2)}{(a_1 + a_2 + 2b_1 + 2b_2)}$) w funkcji czasu

wysymulowane przy pomocy równań (56)-(61) [228].

Możliwa jest także niestabilność stanu stacjonarnego prowadząca do powstawania odpowiednich struktur w układach przestrzennych, gdyż taka niestabilność wymaga, aby współczynnik dyfuzji dla dimerów był mniejszy niż dla monomerów, co jest fizycznie całkowicie uzasadnione.

Co najmniej dwie zaobserwowane sytuacje eksperymentalne czynią prezentowany model użytecznym. Po pierwsze, autokatalityczna dimeryzacja została odkryta w reakcjach chemicznych, w których następuje łamanie symetrii zwierciadlanej enancjomerów (reakcje Soai [256]). Po drugie, oscylacje wywodzące się z autokatalitycznej dimeryzacji asocjacyjnej winny być wyraźniejsze w niższej temperaturze, ponieważ równowaga dimeryzacji (56) powinna być przesunięta w stronę powstawania dimerów. Takie oscylacje zostały zaobserwowane w niskich temperaturach w przypadku eksperymentów przeprowadzonych w Zakładzie Chemii Ogólnej i Chromatografii Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego [129,257,258].

7.5.5. Model I z uwzględnieniem kondensacji [228]

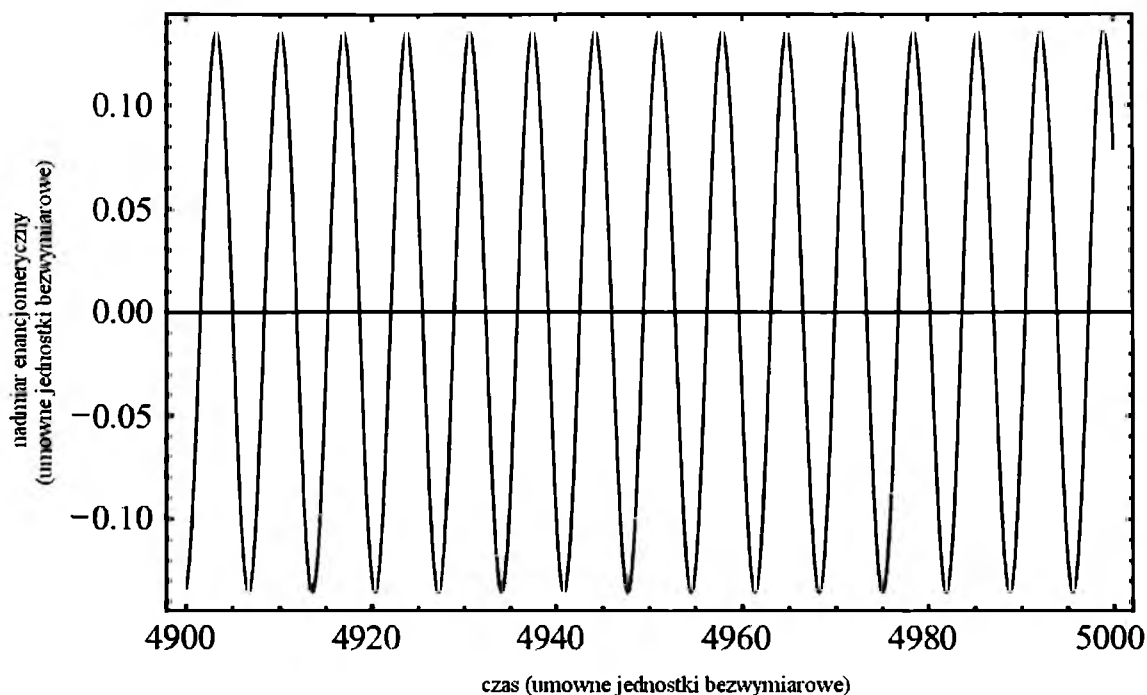
Kolejno opracowano model wykorzystujący model Plassona i współpracowników [259]. W naszym modelu oscylacje pojawiają się jako wynik oddziaływań między enancjomerami i wydaje się on szczególnie dobrze opisywać takie układy, w których zachodzi kondensacja i gdzie kondensat SR ma inne właściwości chemiczne, niż RS. Model ten został przedstawiony w postaci szeregu równań reakcji biegnących równolegle w czasie (równania (64)-(68)).



gdzie: S i R – monomery odpowiednich enancjomerów S i R, S* i R* - ich aktywne formy, S₂ i R₂ – homodimery kondensacyjne antymerów S i R, a SR i RS – heterodimery kondensacyjne powstałe z enancjomerów S i R.

Równanie reakcji (64) obrazuje aktywację poszczególnych enancjomerów, po którym następuje homo- i hetero-kondensacja z użyciem aktywnych form antymerów (65) i (67). Źródłem monomerów jest rozpad (hydroliza) homokondensatu (66), a reakcja epimeryzacji (68) jest etapem, w którym zachodzi inwersja chiralna. Oscylacje pojawiają się w układzie (64)-(68) tylko wówczas, kiedy stałe szybkości tworzenia się heterodimerów kondensacyjnych (67) są większe, niż homodimerów kondensacyjnych (65).

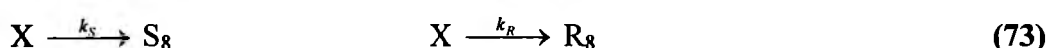
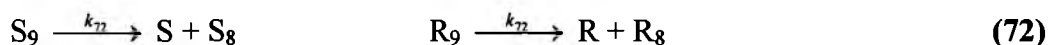
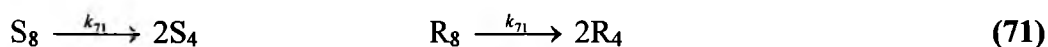
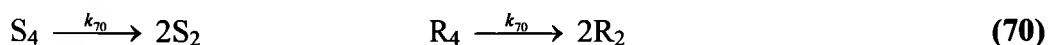
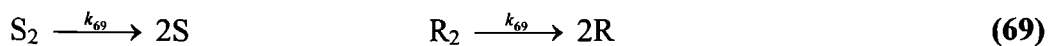
Zestawowi równań stechiometrycznych (64)-(68) odpowiadają równania kinetyczne, które po scałkowaniu w programie Matlab pozwoliły na uzyskanie oscylacyjnych zmienności nadmiaru enancjomerycznego w czasie, co przedstawiono graficznie na Rys. 111.



Rys. 111. Zmiany wartości nadmiaru enancjomerycznego ($e.e. = \frac{([R] - [S] + 2[R_2] - 2[S_2])}{c}$) w funkcji czasu wysymulowane przy pomocy równań (64)–(68) dla $c=1$, $k_{64}=1$, $k_{64}=0,1$, $k_{65}=1$, $k_{66}=1$, $k_{67}=100$, $k_{68}=1$ [228].

7.5.6. Model z uwzględnieniem asocjacji poprzez wiązania wodorowe i kondensacji [234]

Zaprezentowany poniżej model dotyczy układu chiralnego, w którym może występować asocjacja poprzez wiązania wodorowe. Przypuśćmy, iż chiralne monomery S i R mogą tworzyć asocjacyjne dimery (S_2 , R_2), trimery i wyższe oligomery (S_i , R_i gdzie $i=4, \dots$). Jeśli uwzględnić wszystkie zachodzące reakcje łączenia się i rozpadu pojedynczych cząsteczek, to powstanie bardzo skomplikowany układ. Możliwe jest jednak wyodrębnienie takiego podukładu, który będzie charakteryzował się oscylacyjnymi zmianami odpowiednich wielkości. Taki podukład został opisany przez Hyvera dla układu achiralnego [260], a tutaj zmodyfikowano go wprowadzając dodatkowy aspekt chiralności. Podukład ten przedstawiają poniższe równania:



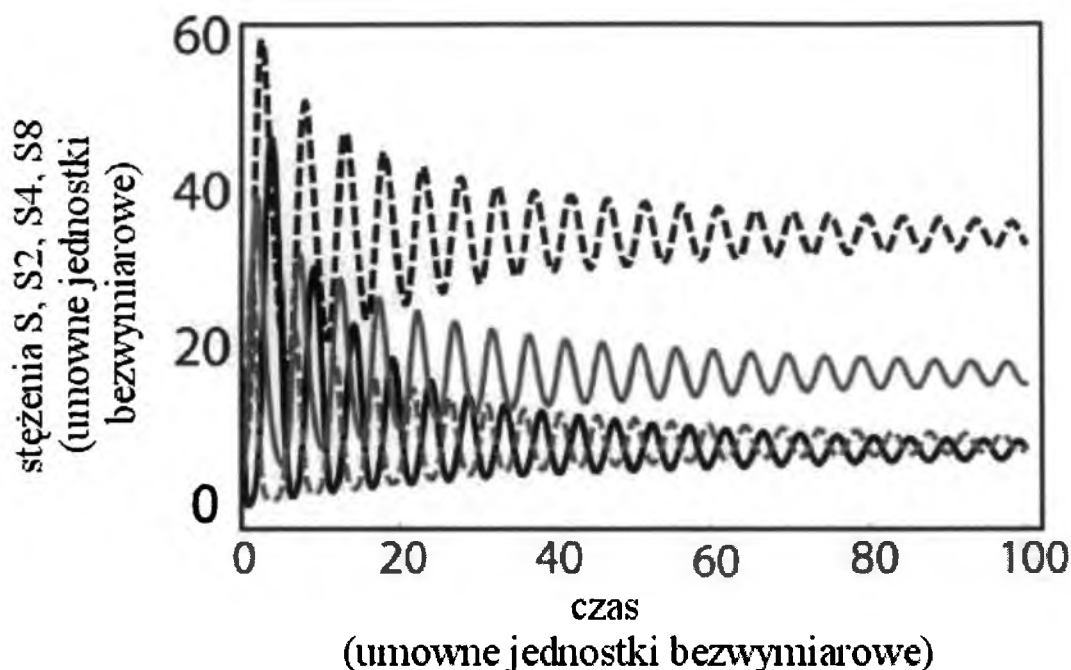
Reakcje (69) przedstawiają rozpad asocjacyjnych homodimerów S_2 i R_2 do pojedynczych cząsteczek. Reakcje (70) opisują rozpad asocjacyjnych homotertramerów S_4 i R_4 do asocjacyjnych homodimerów S_2 i R_2 . Reakcje (71) przedstawiają rozpad asocjacyjnych homooktamerów S_8 i R_8 do asocjacyjnych homotetramerów S_4 i R_4 . Reakcje (72) opisują rozpad asocjacyjnych homononamerów S_9 i R_9 do monomerów (S i R) i homooktamerów (S_8 i R_8). Reakcja (74) reprezentuje racemizację, która jest reakcją pierwszorzędową i wolniejszą od innych reakcji w rozpatrywanym układzie. Układ ten nie zawiera żadnych kroków autokatalizy i jest otwarty dzięki zbiorowi wyższych oligomerów X , które rozpadają się na oligomery niższe (reakcja (73)). Ten zbiór oligomerów nie może zawierać równych ilości enancjomerów i dlatego stałe k_R i k_S powinny być różne. Aby dodatkowo zawrzeć w proponowanym modelu proces kondensacji monomerów, do schematu Hyvera dodano dodatkowe kroki:



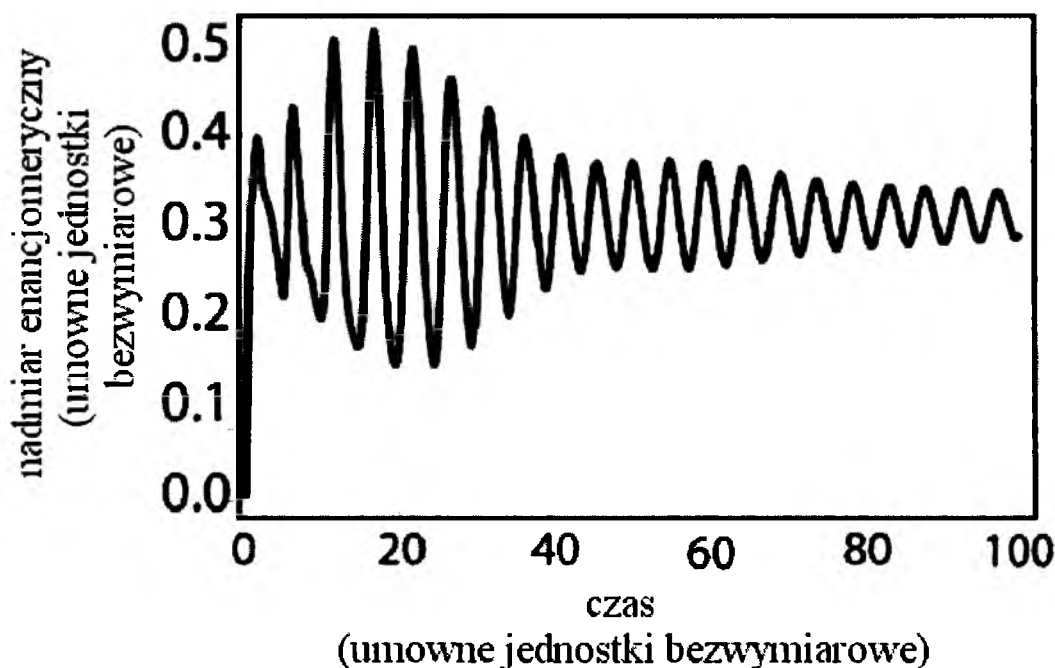
gdzie S_2' , R_2' i RS oznaczają kondensaty enancjomerów S i R , w których molekuły monomerów łączą się ze sobą poprzez wiązania kowalencyjne.

Założono, iż reakcje kondensacji (75) są znacznie wolniejsze od reakcje rozpadu asocjatów poprzez wiązania wodorowe (69)-(73).

Zestawowi równań stechiometrycznych (69)-(75) odpowiadają określone równania kinetyczne, które po scałkowaniu numerycznym w programie Matlab pozwoliły na uzyskanie oscylacyjnych zmienności w czasie stężeń określonych substratów reakcji oraz nadmiaru enancjomerycznego. Wybrane wyniki przedstawiono graficznie na Rys. 112 i 113.



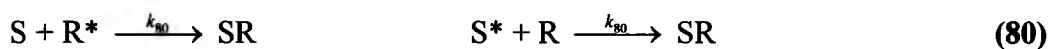
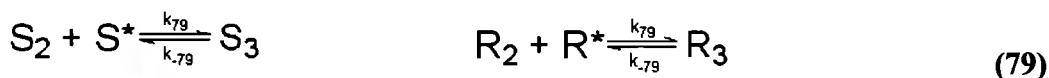
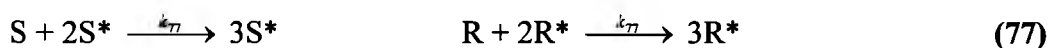
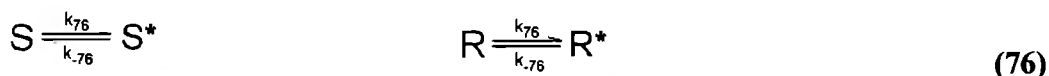
Rys. 112. Zmiany stężenia S (czarna linia ciągła), S₂ (czarna linia przerywana), S₄ (szara linia ciągła) i S₈ (szara linia przerywana) w funkcji czasu wysymulowane przy pomocy równań (69)–(75) dla $k_{69}=k_{70}=k_{71}=k_{72}=1$, $k_{74}=k_{74}=0,1$, $k_{75}=0,001$, $k_5=80$ i $k_R=40$. Warunki początkowe: $[S]=18$, stężenia pozostałych indywiduów równe 6 [234].



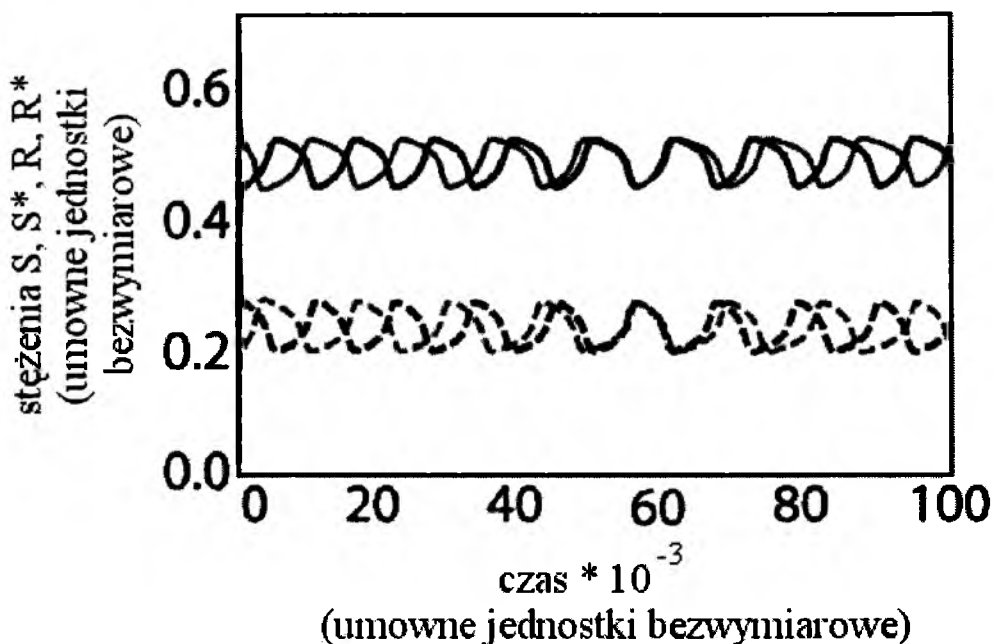
Rys. 113. Zmiany wartości nadmiaru enancjomerycznego ($e.e. = \frac{([S] + 2[S_2] + 4[S_4] + 8[S_8] - [R] - 2[R_2] - 4[R_4] - 8[R_8])}{([S] + 2[S_2] + 4[S_4] + 8[S_8] + [R] + 2[R_2] + 4[R_4] + 8[R_8])}$) w funkcji czasu wysymulowane przy pomocy równań (69)–(75). Warunki początkowe: $[S]=18$, stężenia pozostałych indywiduów równe 6 [234].

7.5.7. Model II z uwzględnieniem kondensacji [234]

Model II zakłada, iż sam etap kondensacji może być wystarczającym źródłem nieliniowości procesu. Poniższy model opiera się na publikacji [261] i ukazuje autokatalityczne tworzenie się aktywnych monomerów S^* i R^* (77). W modelu tym nie zakłada się koniecznej obecności asocjatów kwasów karboksylowych poprzez wiązania wodorowe (np. dimerów asocjacyjnych) jako kluczowego procesu przy generowaniu oscylacyjnych zmian stężenia substancji wyjściowych oraz oscylacyjnych zmian nadmiaru enancjomerycznego



Ten układ jest zamknięty ze względu na wymianę masy, tj. całkowite stężenie monomerów $c=[S]+[S^*]+2[S_2]+3[S_3]+[R]+[R^*]+2[R_2]+3[R_3]$ jest stałe. Stężenie dimerów i trimerów oscyluje z małą amplitudą (Rys. 114). W takim układzie wydaje się, że tylko oscylacyjne zmiany stężeń monomerów mogą być dostrzegalne.

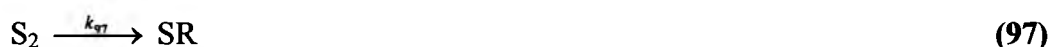
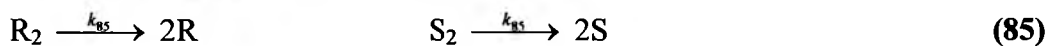
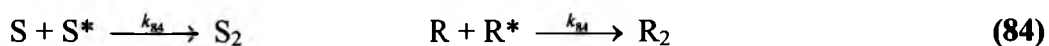
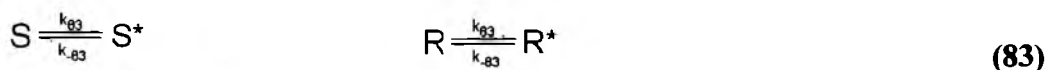


Rys. 114. Zmiany stężenia S (czarna linia ciągła), S* (czarna linia przerywana), R (szara linia ciągła) i R* (szara linia przerywana) w funkcji czasu wysymulowane przy pomocy równań (76)–(82) dla $k_{76}=0,02048$, $k_{76}=8,1k_{76}$, $k_{77}=1$, $k_{78}=10^{-8}$, $k_{79}=10^{-8}$, $k_{79}=10^{-4}$, $k_{79}=0,2479k_{79}$, $k_{80}=10^{-8}$, $k_{81}=10^{-8}$ i $k_{82}=k_{82}=10^{-8}$. Warunki początkowe: $[S]=0,25$, $[S^*]=0,5$, $[S_2]=[S_3]=0,05$, $[R]=0,7$, $[R^*]=0,05$, $[R_2]=[R_3]=0,04$ i $[SR]=0$ [234].

Zestawowi równań stechiometrycznych (76)–(82) odpowiadają określone równania kinetyczne, które po scałkowaniu pozwoliły na uzyskanie oscylacyjnych zmian stężeń monomerów w czasie, co przedstawiono graficznie na Rys. 114.

7.5.8. Model III z uwzględnieniem kondensacji [234]

W ostatnim modelu oscylacje pojawiają się w wyniku oddziaływań między enancjomerami, prowadzących do powstania dimerów kondensacyjnych [259]. Model ten jest specjalnie przeznaczony dla układu, w którym kondensat SR ma inne właściwości chemiczne niż kondensat RS, a zjawisko inwersji chiralnej monomerów nie jest wyodrębnione jako osobny proces, lecz zachodzi w wyniku powstania, przegrupowania i dysocjacji dimerów związanych wiązaniem kowalencyjnym.

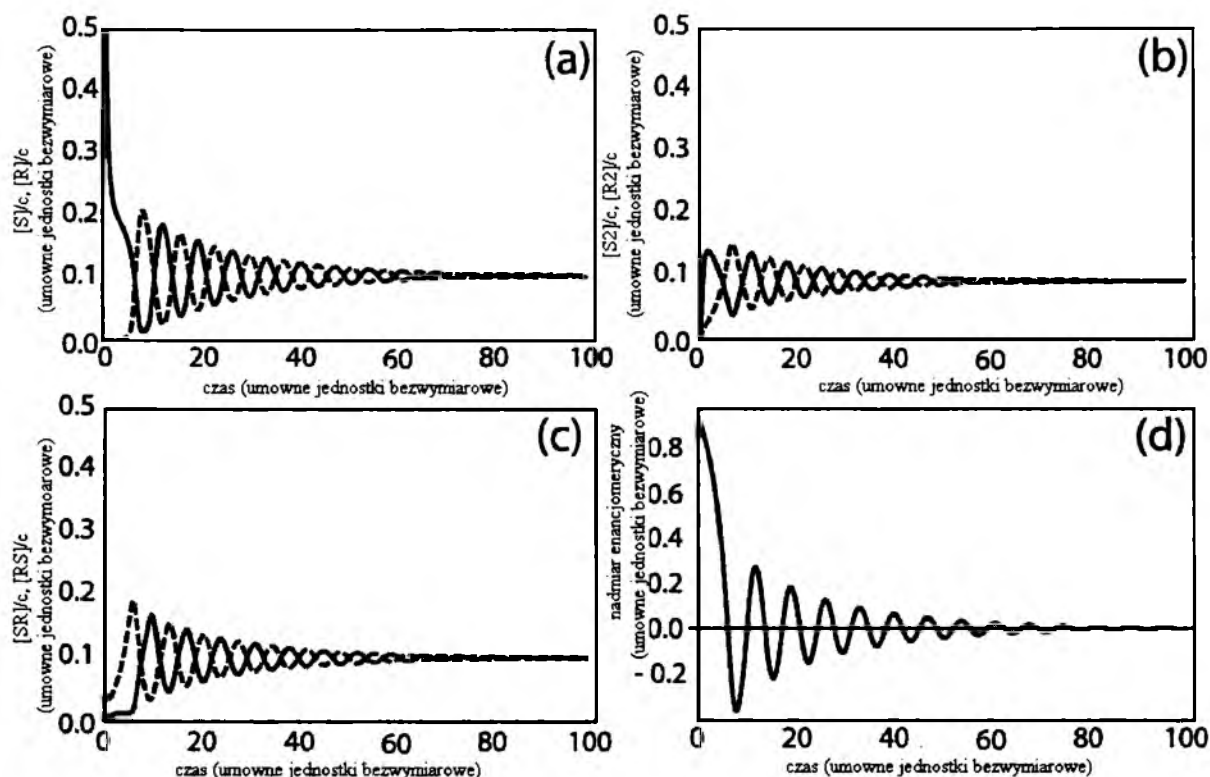


Oscylacje pojawiają się w układzie (83)-(97) tylko wówczas, gdy stałe szybkości dla tworzenia się heterodimerów (86) i (87) są większe niż dla homodimerów (84). Układ ten jest zamknięty ze względu na wymianę masy, tj. całkowite stężenie monomerów $c=[S] + [R] + [S^*] + [R^*] + 2([S_2] + [R_2] + [RS] + [SR])$ jest stałe.

Skoro RS i SR mają różne właściwości chemiczne, to: $k_{86} \neq k_{87}$, $k_{88} \neq k_{89} \neq k_{94} \neq k_{95}$, $k_{90} \neq k_{91} \neq k_{96} \neq k_{97}$ i $k_{92} \neq k_{93}$. Tłumione oscylacje w zamkniętym układzie pojawiają się dla szerokiego zakresu wartości parametrów. Dynamika zawiera stan stacjonarny będący stałym centrum dla ujemnej wartości własnej, której część rzeczywista przyjmuje niską wielkość. Takie dynamiczne zachowanie prowadzi do tłumionych oscylacji, których amplituda maleje powoli wraz z czasem.

Zestawowi równań stechiometrycznych (83)-(93) odpowiadają równania kinetyczne, które po scałkowaniu numerycznym w programie Matlab pozwoliły na uzyskanie oscylacyjnych zmienności w czasie stężeń określonych substratów reakcji oraz nadmiaru enancjomerycznego. Wybrane wyniki przedstawiono graficznie na Rys. 115. Nieuwzględnione na tym wykresie stężenia aktywnych monomerów S^* i R^* są około 40 razy

mniejsze od stężeń innych badanych indywiduów chemicznych. Te aktywne formy mogą być wykryte tylko *in situ*, ponieważ istnieją jedynie w mieszaninie reakcyjnej.



Rys. 115. Zmiany stężenia: (a) S (linia ciągła) i R (linia przerywana), (b) S_2 (linia ciągła) i R_2 (linia przerywana), (c) RS (linia ciągła) i SR (linia przerywana) oraz (d) zmiany wartości nadmiaru enancjomerycznego ($e.e. = \frac{([R] - [S] + [R^*] - [S^*] + 2[R_2] - 2[S_2])}{c}$) w funkcji czasu wysymulowane za pomocą równań

(83)–(93) dla $c=2$, $k_{83}=k_{84}=k_{83}=k_{88}=k_{89}=1$, $k_{83}=k_{90}=k_{91}=k_{92}=k_{93}=0,1$ i $k_{86}=k_{87}=100$. Warunki początkowe:

$[S]=1,9$, $[R]=0,1$, stężenia pozostałych indywiduów równe 0 [234].

W Rozdz. 7.5.6–8 zaprezentowano trzy modele pozwalające na symulację układów, w których dochodzi do oscylacyjnej inwersji chiralnej i oscylacyjnej polikondensacji, a w szczególności pozwalających na obserwację oscylacyjnego zachowania zbioru oligomerów i nadmiaru enancjomerycznego. Bardziej szczegółowe modele wymagają jeszcze lepszego scalenia obserwacji pochodzących z różnych ustawień badanych procesów. Jednak dopóki niedostępne są bardziej szczegółowe dane kinetyczne, nie ma sensu podejmowanie prób konstrukcji bardziej precyzyjnych modeli.

7.6. Wnioski

W niniejszej pracy udało się zrealizować wszystkie, na początku założone cele badawcze. Jako zasadnicze osiągnięcia tej pracy należy wymienić, co następuje:

- I. Stosując jako podstawowe narzędzie badawcze chromatografię cienkowarstwową, wspomaganą przy pomocy odpowiednich pomiarów polarymetrycznych, udało się wykazać, iż roztwory czterech wybranych związków (tj. flurbiprofenu, α -fenyloglicyny, kwasu migdałowego i ketoprofenu) w niskocząsteczkowych rozpuszczalnikach wodnych oraz niewodnych ulegają samorzutnemu procesowi oscylacyjnej inwersji chiralnej, prawdopodobnie poprzez enol. Stwierdzono, że zjawisko to zachodzi niezależnie od długości łańcucha badanego związku chiralnego oraz od klasy chemicznej, do której związek ten należy.
- II. Pogłębione badania doświadczalne z zastosowaniem spektroskopii ^{13}C NMR, wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz spektrometrii mas, wykazały, że inwersji chiralnej rozpatrywanych związków wyjściowych towarzyszy ich polikondensacja. Oba te procesy są ze sobą sprzężone, zachodząc w sposób niemonotoniczny, a nawet oscylacyjny. Tak więc proces chiralnej inwersji można traktować jako równoległy do procesu polikondensacji.
- III. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy zwracają uwagę na wielką przydatność techniki chromatografii cienkowarstwowej do prowadzenia określonych badań, zwłaszcza z zakresu chemii fizycznej.
- IV. Ponadto w niniejszej pracy przy współpracy z prof. Irvingiem. R. Epsteinem (Brandeis University, Waltham, Massachusetts, USA) udało się opracować model dwóch sprzężonych Templatorów, wykorzystywany do symulacji zachodzenia procesów oscylacyjnej inwersji chiralnej i oscylacyjnej kondensacji dla alifatycznych niskocząsteczkowych kwasów karboksylowych.

8. Streszczenie

Wcześniejsze badania nad zachowaniem chiralnych pochodnych kwasu propionowego (w tym m.in. dwóch arylowych pochodnych tego kwasu, tj. *S*-(+)-ibuprofenu i *S*-(+)-naproksenu), należących do grupy leków profenowych i rozpuszczonych w rozpuszczalnikach wodnych oraz w rozpuszczalniku niewodnym po raz pierwszy wykazały, iż związki te w warunkach abiotycznych mogą *in vitro* ulegać samorzutnej, oscylacyjnej inwersji chiralnej, w ten sposób przekształcając się we własne antymery. Badania te zademonstrowały istotną i wcześniej nie stwierdzoną labilność steryczną w warunkach pozaustrojowych wybranych, chiralnych pochodnych kwasu propionowego. Uzyskane w ramach tych badań wyniki zostały przedstawione m.in. w pracy [134].

Wstępne wyniki dotyczące wykazanej labilności sterycznej kilku wybranych pochodnych kwasu propionowego z grupy profenów oraz oscylacyjnego charakteru obserwowanych inwersji skłoniły mnie do refleksji w odniesieniu do prawdopodobnej powszechności tego zjawiska. W ramach niniejszych badań postanowiłam sprawdzić, przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej i polarymetrii, czy zjawisko inwersji chiralnej dotyczy również innych, niż ibuprofen i naproksen, związków z grupy profenów, tj. ketoprofenu i flurbiprofenu. Jednocześnie wytypowałam do badań dwie pochodne kwasu octowego (α -fenyloglicynę i kwas migdałowy), odgrywające znaczącą rolę w medycynie i kosmetologii, celem znalezienia odpowiedzi na pytanie, czy wspomniana wyżej niestabilność steryczna jest zależna od długości łańcucha węglowego. Ponadto wydawało się, iż ze względów energetycznych reakcja inwersji chiralnej nie może być jedynym krokiem elementarnym rozpatrywanego procesu. Pogłębione badania doświadczalne z zastosowaniem spektroskopii ^{13}C NMR, wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz spektroskopii mas, wykazały, że inwersji chiralnej wszystkich rozpatrywanych związków wyjściowych towarzyszy ich polikondensacja, co w rezultacie prowadzi do powstawania kondensatów o różnej liczbie skondensowanych jednostek monomerycznych. Oba te procesy są ze sobą sprzężone, zachodząc w sposób niemonotoniczny, a nawet oscylacyjny. Najbardziej prawdopodobny mechanizm procesu chiralnej inwersji profenów, hydroksykwasów i aminokwasów prowadzi poprzez produkt pośredni – enol. Ponadto proces chiralnej inwersji można traktować jako równoległy do procesu polikondensacji.

Przy współpracy z prof. Irvingiem R. Epsteinem z Brandeis University w Waltham, Massachusetts (USA) udało się opracować model dwóch sprzężonych Templatorów, wykorzystywany do symulacji procesów oscylacyjnej inwersji chiralnej i oscylacyjnej

kondensacji dla alifatycznych niskocząsteczkowych kwasów karboksylowych. Podstawą tego modelu było zdefiniowanie odpowiedniego szablonu, który katalizowałby proces inwersji chiralnej pojedynczego wyjściowego kwasu karboksylowego. Jako odpowiednie szablony kolejno proponowano homodimery asocjacyjne poprzez wiązania wodorowe, wyższe asocjaty związane wiązaniami wodorowymi, kondensaty związane wiązaniami kowalencyjnymi oraz kombinacje asocjatów i kondensatów. Uzyskiwane w tych modelach oscylacyjne zmiany stężenia odpowiednich reagentów i towarzyszące im oscylacyjne zmiany nadmiaru enancjomerycznego w funkcji czasu były w sposób jakościowy porównywane z wynikami pomiarów chromatograficznych i polarymetrycznych.

9. Literatura

- [1] W. Rhys-Williams, F. McCarthy, J. Baker, Y.-F. Hung, M. J. Thomason, A. W. Lloyd, G. W. Hanlon, *Enzyme Microb. Tech.*, **22**, 281 (1998)
- [2] K. Williams, R. Day, R. Knihinicki, A. Duffield, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 3403 (1986)
- [3] N. M. Davies, *J. Chromatogr. B*, **691**, 229 (1997)
- [4] <http://goldpharma.com/deal/lang/POLISH/>
- [5] I. K. Reddy, R. Mehvar, „Chirality in Drug Design and Development”, Marcel Dekker, New York, 2004
- [6] <http://www.cyf-kr.edu.pl/com/aspiryna/index.htm>
- [7] D. A. Williams, T. L. Lemke, „Foye’s Principles of Medicinal Chemistry”, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001
- [8] L. Stryer, „Biochemia”, PWN, Warszawa, 2003
- [9] V. Wsól, L. Skálová, B. Szotáková, *Curr. Drug Metab.*, **5**, 517 (2004)
- [10] B. W. Berry, F. Jamali, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **258**, 695 (1991)
- [11] C. Sewoz, E. Rousselle, E. Benoît, T. Buronfosse, *Xenobiotica*, **29**, 1007 (1999)
- [12] M. F. San Martin, A. Soraci, F. Fogel, O. Tapia, S. Islas, *Vet. Res. Commun.*, **26**, 323 (2002)
- [13] E. Freneaux, B.A. Fromenty, A. Berson, G. Labbe, C. Degott, P. Letteron, D. Larrey, D. Pessayre, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **255**, 529 (1990)
- [14] C. Kemal, J.E. Casida, *Life Sci.*, **50**, 533 (1992)
- [15] M. F. Landoni, A. Soraci, *Curr. Drug Metab.*, **2**, 37 (2001)
- [16] J. Caldwell, A. J. Hutt, S. Fournel, *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 105 (1988)
- [17] N. Muller, E. Payan, F. Lopicque, B. Bannwarth, P. Netter, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **4**, 617 (1990)
- [18] N. N. Singh, F. Jamali, F. M. Pasutto, A. S. Russell, R. T. Coutts, K. S. Drader, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 439 (1986)
- [19] S. M. Sanins, W. J. Adams, D. G. Kaiser, G. W. Halstead, T. A. Baillie, *Drug Matab. Dis.*, **18**, 527 (1990)
- [20] G. Geisslinger, O. Shuster, K.-P. Stock, D. Loew, G. L. Bach, K. Brune, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **38**, 493 (1990)
- [21] S. M. Sanins, W. J. Adams, D. G. Kaiser, G. W. Halstead, J. Hosley, H. Barnes, T. A. Baillie, *Drug Matab. Dis.*, **19**, 405 (1991)
- [22] K. M. Knights, T. F. Addinall, B. J. Roberts, *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 1775 (1991)

- [23] M. A. Shirley, X. Guan, D. G. Kaiser, G. W. Halstead, T. A. Baillie, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **269**, 1166 (1994)
- [24] S. Menzel, R. Waibel, K. Brune, G. Geisslinger, *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 1056 (1994)
- [25] A. M. Evans, *J. Clin. Pharmacol.*, **36**, 7S (1996)
- [26] W. Neupert, R. Brugger, C. Euchenhofer, K. Brune, G. Geisslinger, *Br. J. Pharmacol.*, **122**, 487 (1997)
- [27] N. M. Davies, *Clin. Pharmacokinet.*, **34**, 101 (1998)
- [28] S. Scheuerer, K. M. Williams, R. Brugger, A. J. McLachlan, K. Brune, R. O. Day, G. Geisslinger, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**, 1138 (1998)
- [29] F. K. Głowska, *Int. J. Pharm.*, **199**, 159 (2000)
- [30] S. C. Tan, B. K. Patel, S. H. D. Jackson, C. G. Swift, A. J. Hutt, *Xenobiotica*, **32**, 683 (2002)
- [31] A. Janssen, T. J. Maier, S. Schiffmann, O. Coste, M. Seegel, G. Geisslinger, S. Görsch, *Eur. J. Pharmacol.*, **540**, 24 (2006)
- [32] R. D. Knihinicki, R. O. Day, G. G. Graham, K. M. Williams, *Chirality*, **2**, 134 (1990)
- [33] B. C. Sallustio, P. J. Meffin, K. M. Knights, *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 1919 (1988)
- [34] E. Benoit, P. Delatour, L. Olivier, J. Caldwell, *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 1717 (1995)
- [35] A. Soraci, P. Jaussad, E. Benoit, P. Delatour, *Vet. Res.*, **27**, 13 (1996)
- [36] E. Castro, A. Soraci, F. Fogel, O. Tapia, *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **23**, 265 (2000)
- [37] R. Mehvar, F. Jamali, *Pharm. Res.*, **5**, 53 (1988)
- [38] A. Soraci, E. Bonoit, *Chirality*, **7**, 534 (1995)
- [39] A. Rubin, M. P. Knadler, P. P. K. Ho, L. D. Bechtol, R. L. Wollen, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 82 (1984)
- [40] R. J. Bopp, J. F. Nash, A. S. Ridolfo, E. R. Shepard, *Drug. Metab. Dispos.*, **7**, 356 (1979)
- [41] R. G. Simmonds, T. J. Woodage, S. M. Duff, J. N. Gren, *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.*, **5**, 169 (1980)
- [42] S. Iwakawa, H. Spahn, L. Z. Benet, E. T. Lin, *Drug Metab. Dispos.*, **19**, 853 (1991)
- [43] M. el Mouelhi, H. W. Ruelius, C. Fenselau, D. M. Dulik, *Drug. Metab. Dispos.*, **15**, 767 (1987)
- [44] J. Cashman, G. McAnulty, *Drugs*, **49**, 51 (1995)
- [45] N. Arima, *J. Pharmacobiodyn.*, **13**, 733 (1990)
- [46] V. Rosetti, A. Lombard, M. Buffa, A. Miglietta, A. Oliviero, E. Gadoni, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **17**, 183 (1992)
- [47] Y. Shinohara, H. Magara, S. Baba, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 1075 (1991)

- [48] E. F. Castro, A. L. Soraci, R. Franci, F. A. Fogel, M. O. Tapia, *Vet. J.*, **162**, 38 (2001)
- [49] R. Żółtaszek, M. Hanausek, Z. M. Kiliańska, Z. Walaszek, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **62**, 451 (2008)
- [50] K. Erb, R. Brugger, K. Williams, G. Geisslinger, *Chirality*, **11**, 103 (1999)
- [51] M. Vakily, F. Jamali, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 638 (1996)
- [52] B. Testa, J. M. Mayer, *Prog. Drug Res.*, **32**, 249 (1988)
- [53] Y. Nakamura, T. Yamaguchi, *Drug Metab. Dispos.*, **15**, 529 (1987)
- [54] Y. Tanaka, Y. Shimomura, T. Hirota, A. Nozaki, M. Ebata, W. Takasaki, E. Shigehara, R. Hayashi, J. Caldwell, *Chirality*, **4**, 342 (1992)
- [55] D. R. Brocks, W. T. C. Liang, F. Jamali, *Chirality*, **5**, 61 (1993)
- [56] P. Delatour, E. Benoit, M. Bourdin, M. Gobron, F. Moysan, *Bull. Acad. Natl. Med.*, **177**, 515 (1993)
- [57] Q. A. McKellar, P. Delatour, P. J. Lees, *Vet. Pharmacol. Therap.*, **17**, 447 (1994)
- [58] P. Delatour, F. Garnier, R. Maire, *Bull. Acad. Natl. Med.*, **180**, 1565 (1996)
- [59] M. J. Thomason, W. Rhys-Williams, A. W. Lloyd, G. W. Hanlon, *J. Appl. Microbiol.*, **85**, 155 (1998)
- [60] S. Mittal, S. Khanna, A. Roy, P. V. Bhratam, H. P. S. Chawla, *Enzyme Microb. Technol.*, **36**, 232 (2005)
- [61] K. Mitsukura, T. Yoshida, T. Nagasawa, *Biotechnol. Lett.*, **24**, 1615 (2002)
- [62] <http://www.doz.pl/leki/r0-ketoprofen>
- [63] European Patent, International Publication No. WO 93/20809
- [64] P. A. Insel, „ Analgesic-antipyretics and antiinflammatory agents: Drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*”, Pergamon Press Inc., New York, 1990
- [65] A. Jörres, H. Dinter, N. Topley, G. M. Gahl, U. Frei, P. Scholz, *Cytokine*, **9**, 119 (1997)
- [66] P. Ghezzi, G. Melillo, C. Meazza, S. Sacco, L. Pellegrini, C. Asti, S. Porzio, A. Marullo, V. Sabbatini, G. Caselli, R. Bertini, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**, 969 (1998)
- [67] P. Mascagani, V. Sabbatini, L. Biordi, S. Martinotti, M. Allegretti, A. Marullo, G. Caselli, R. Bertini, *European Cytokine Network*, **11**, 185 (2000)
- [68] A. L. Ong, A. H. Kamaruddin, S. Bhatia, *Proc. Biochem.*, **40**, 3526 (2005)
- [69] United States Patent No. 4,983,765
- [70] United States Patent No. 5,510,519
- [71] United States Patent No. 5,162,576
- [72] United States Patent No. 5,677,469

- [73] J. N. Jin, S. H. Lee, S. B. Lee, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **26**, 209 (2003)
- [74] Z.-D. Long, J.-H. Xu, L.-L. Zhao, J. Pan, S. Yang, L. Hua, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **47**, 105 (2007)
- [75] M. T. E. Gihani, J. M. Williams, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 11 (1999)
- [76] C. R. Verde, M. I. Simpson, A. Frigoli, M. F. Landoni, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **24**, 179 (2001)
- [77] K. Akira, T. Taira, H. Hasegawa, C. Sakuma, Y. Shinohara, *Drug Metab. Dis.*, **26**, 457 (1998)
- [78] B. C. Sallustio, Y. J. Purdie, A. G. Whitehead, M. J. Ahern, P. J. Meffin, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **26**, 765 (1988)
- [79] F. Jamali, R. Mehvar, F. M. Pasutto, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 695 (1989)
- [80] F. Jamali, A. S. Russell, R. T. Foster, C. Lemko, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 460 (1990)
- [81] S. Menzel-Soglowek, G. Geisslinger, J. Mollenhauer, K. Brune, *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 1487 (1992)
- [82] A. C. Rudy, Y. Liu, C. Brater, S. D. Hall, *J. Clin. Pharmacol.*, **38**, S3 (1998)
- [83] F. K. Głównka, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1035 (2002)
- [84] F. K. Głównka, M. Karaźniewicz, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **35**, 807 (2004)
- [85] R. T. Foster, F. Jamali, *Drug Metabol. Dispos.*, **16**, 623 (1988)
- [86] S. Menzel, W. S. Beck, K. Brune, G. Geisslinger, *Chirality*, **5**, 422 (1993)
- [87] G. Aberg, V. B. Ciofalo, R. G. Pendleton, G. Ray, D. Weddle, *Chirality*, **7**, 383 (1995)
- [88] C. J. Meunier, R. K. Verbeeck, *Drug Metabol. Dispos.*, **27**, 26 (1998)
- [89] C. J. Meunier, R. K. Verbeeck, *Pharm. Res.*, **16**, 1081 (1999)
- [90] A. Abas, P. J. Meffin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **240**, 637 (1987)
- [91] P. Lees, P. M. Taylor, F. M. Landoni, A. K. Arifah, C. Waters, *Vet. J.*, **165**, 21 (2003)
- [92] M. F. Landoni, W. Comas, N. Mucci, G. Anglarilli, D. Bidal, P. Lees, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **22**, 349 (1999)
- [93] D. Mauleon, R. Mis, J. Ginesta, E. Ortega, J. Vilageliu, N. Basi, G. Carganico, *Chirality*, **6**, 537 (1994)
- [94] M. F. Landoni, P. Lees, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **19**, 466 (1996)
- [95] S. Corveleyn, D. Henrist, J. P. Remon, G. van der Weken, W. Baeyens, J. Haustraete, H. Y. Aboul-Enein, B. Sustronck, P. Deprez, *Res. Vet. Sci.*, **67**, 201 (1999)
- [96] M. F. Landoni, P. Lees, *Chirality*, **7**, 586 (1995)
- [97] L. Igarza, A. Soraci, N. Auza, H. Zeballos, *Vet. Res. Commun.*, **26**, 29 (2002)
- [98] F. Jamali, R. Lovlin, G. Aberg, *Chirality*, **9**, 29 (1997)

- [99] <http://www.przychodnia.pl/el/rejestr.php3?s=&d=&p1=0&skladnik=600>
- [100] <http://www.doz.pl/leki/s798-flurbiprofen>
- [101] G. Geisslinger, S. S. Menzel, W. S. Beck, K. Brune, *Agents. Actions Suppl.*, **44**, 31 (1993)
- [102] N. M. Davies, *Clin. Pharmacokinet.*, **28**, 100 (1995)
- [103] G. Geisslinger, H. G. Schaible, *J. Clin. Pharmacol.*, **36**, 513 (1996)
- [104] B. Aeverbeck, M. Peisler, I. Izydorczyk, P. W. Reeh, *Inflamm. Res.*, **52**, 519 (2003)
- [105] A. M. Panico, V. Cardile, F. Vittorio, G. Ronsisvalle, G. M. Scoto, C. Parenti, B. Gentile, R. Morrone, G. Nicolosi, *Il Farmaco*, **58**, 1339 (2003)
- [106] A. A. von Sorge, „Reflections on flurbiprofen eyedrops”, praca doktorska, University of Groningen, Groningen, Holandia, 2002
- [107] M. Karolkiewicz, „Alzheimer w kleszczach”, *Przegląd*, 26/2008
- [108] T. Pietras, M. Banasiak, W. Musiał, *Postępy Psychiatrii i Neurologii*, **17**, 145 (2008)
- [109] T. L. Kukar, T. B. Ladd, M. A. Bann, P. C. Fraering, R. Narlawar, G. M. Maharvi, B. Healy, R. Chapman, A. T. Welzel, R. W. Price, B. Moore, V. Rangachari, B. Cusack, J. Eriksen, K. Jansen-West, C. Verbeeck, D. Yager, C. Eckman, W. Ye, S. Sagi, B. A. Cottrell, J. Torpey, T. L. Rosenberry, A. Fauq, M. S. Wolfe, B. Schmidt, D. M. Walsh, E. H. Koo, T. E. Golde, *Nature*, **453**, 925 (2008)
- [110] R. Kaliszan, K. Macur, „Na tropie środków przydatnych w terapii lub profilaktyce choroby Alzheimer’a”, *Forum Medycyny Rodzinnej*, 1/2010
- [111] W. J. Wechter, D. D. Leipold, E. D. Murray Jr., D. Quiggle, J. D. McCracken, R. S. Barrios, N. M. Greenberg, *Cancer Res.*, **60**, 2203 (2000)
- [112] W. J. Wechter, E. D. Murray Jr., D. Kantoci, D. D. Quiggle, D. D. Leipold, K. M. Gibson, J. D. McCracken, *Life Sci.*, **66**, 745 (2000)
- [113] G. Lu, R. Franzén, X. J. Yu, Y. J. Xu, *Chinese Chem. Lett.*, **17**, 461 (2006)
- [114] Y. Terao, Y. Ijima, H. Kakidani, H. Ohta, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **76**, 2395 (2003)
- [115] F. Jamali, B. W. Berry, M. R. Tehrani, A. S. Russell, *J. Pharm. Sci.*, **77**, 666 (1988)
- [116] S. Menzel-Soglowek, G. Geisslinger, W. S. Beck, K. Brune, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 888 (1992)
- [117] C. Wolff, „Dynamic Stereochemistry of Chiral Compounds. Principles and Applications”, RSC Publishing, Cambridge, 2008
- [118] E. J. Ebberts, G. J. A. Ariaans, J. P. M. Houbiers, A. Bruggink, B. Zwanenburg, *Tetrahedron*, **53**, 9417 (1997)
- [119] X. Yuchun, L. Huizhou, C. Jiayong, *Int. J. Pharm.*, **196**, 21 (2000)

- [142] B. B. Carson, R. A. Dodge, S. A. Harris, J. S. Yeaw, *Org. Synth., Coll.*, **1**, 336 (1941)
- [143] <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Pseudomonas+sp>
- [144] B.-Y. Kim, K.-C. Hwang, H.-S. Song, N. Chung, W.-G. Bang, *Biotechnol. Lett.*, **22**, 1871 (2000)
- [145] H.-R. Huang, J.-H. Xu, Y. Xu, J. Pan, X. Liu, *Tetrahedron: Asymmetry*, **16**, 2113 (2005)
- [146] H.-R. Huang, J.-H. Xu, *Biochem. Eng. J.*, **30**, 11 (2006)
- [147] S. Tsuchiya, K. Miyamoto, H. Ohta, *Biotechnol. Lett.*, **14**, 1137 (1992)
- [148] S.H. Lee, J.H. Choi, S.H. Park, J.I. Choi, S.Y. Lee, *Enzyme Microb. Technol.*, **35**, 429 (2004)
- [149] K. Dąbrowska, K. W. Szewczyk, *Biochem. Eng. J.*, **46**, 147(2009)
- [150] G. L. Kenyon, G. D. Hegeman, *Biochemistry*, **9**, 4036 (1970)
- [151] L. Drummond, J. Caldwell, H. K. Wilson, *Xenobiotica*, **20**, 159 (1990)
- [152] P. Marchand, L. Lefèbvre, F. Querniard, P. Cardinaël, G. Perez, J.-J. Counieux, G. Coquerel, *Tetrahedron: Asymmetry*, **15**, 2455 (2004)
- [153] IPCS Environmental Health Criteria 190, WHO, Geneva, 1997
- [154] ACGIH, Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices for 1998-1999, ACGIH, Cincinnati, OH, 1999
- [155] J. A. Bond, H. M. Bolt, *Crit. Rev. Toxicol.*, **19**, 227 (1989)
- [156] K. Przybulewska, A. Wieczorek, *Post. Mikrobiol.*, **45**, 51 (2006)
- [157] S. Kežić, I. Jakaša, M. Wenker, *J. Chromatogr. B*, **738**, 39 (2000)
- [158] C.-Y. Hung, H.-H. Huang, C.-C. Hwang, *Ecl. Qium.*, **30**, 67 (2005)
- [159] M. Zougagh, L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A*, **1104**, 331 (2006)
- [160] J. K. Whitesell, D. Reynolds, *J. Org. Chem.*, **48**, 3548 (1983)
- [161] S. P. Zingg, E. M. Arnett, A. T. McPhail, A. A. Bothnerby, W. R. Gilkerson, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1565 (1988)
- [162] United States Patent No. 3,957,758
- [163] United States Patent No. 4,391,826
- [164] K. Yamamoto, K. Oishi, I. Fusimatsu, K. Komatsu, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3028 (1991)
- [165] W. F. Marshall, J. E. Blair, *Mayo Clinic Proceedings*, **74**, 187 (1999)
- [166] P. L. van Putten, *Antonie van Leeuwenhoek*, **45**, 622 (1979)
- [167] M. B. Taylor, *Cosmetic Dermatology*, **21**, 26 (1999)
- [168] <http://www.panacea.pl/print.php?what=article&id=172>

- [169] United States Patent No. 5,932,619
- [170] L. J. Zaneveld, R. A. Anderson, X. H. Diao, D. P. Waller, C. Chany, K. Feathergill, G. Doncel, M. D. Cooper, B. Herold, *Fertil Steril.*, **78**, 1107 (2002)
- [171] B. C. Herold, I. Scordi-Bello, N. Cheshenko, D. Marcellino, M. Dzuzelewski, F. Francois, R. Morin, V. Mas Casullo, R. A. Anderson, C. Chany II, D. P. Waller, L. J. D. Zaneveld, M. E. Klotman, *J. Virol.*, **76**, 11236 (2002)
- [172] R. A. Anderson, K. A. Feathergill, D. P. Waller, L. J. D. Zaneveld, *J. Androl.*, **27**, 568 (2006)
- [173] T. L. Chang, N. Teleshova, A. Rapista, M. Paluch, R. A. Anderson, D. P. Waller, L. J. D. Zaneveld, A. Granelli-Piperno, M. E. Klotman, *FEBS Lett.*, **581**, 4596 (2007)
- [174] C. Wolf, *Chem. Rev.*, **34**, 595 (2005)
- [175] O. Trapp, G. Schoetz, V. Schurig, *Chirality*, **13**, 403 (2001)
- [176] IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2nd Edition (1997)
- [177] O. Trapp, V. Schurig, *Comput. Chem.*, **25**, 187 (2001)
- [178] L. Pasti, A. Cavazzini, M. Nassi, F. Dondi, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 1000 (2010)
- [179] W. R. Melander, H.-J. Lin, J. Jacobsen, C. Horváth, *J. Chromatogr.*, **234**, 269 (1982)
- [180] W. R. Melander, H.-J. Lin, J. Jacobsen, C. Horváth, *J. Phys. Chem.*, **88**, 4527 (1984)
- [181] J. Jacobsen, W. R. Melander, G. Vaisnis, C. Horváth, *J. Phys. Chem.*, **88**, 4536 (1984)
- [182] B. Stephan, H. Zinner, F. Kastner, A. Mannschreck, *Chimia*, **44**, 336 (1990)
- [183] A. Mannschreck, H. Zinner, N. Pustet, *Chimia*, **43**, 165 (1989)
- [184] A. Mannschreck, L. Kiessl, *Chromatographia*, **28**, 263 (1989)
- [185] J. Veciana, M. I. Crespo, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**, 74 (1991)
- [186] O. Trapp, S. Caccamese, C. Schmidt, V. Böhmer, V. Schurig, *Tetrahedron: Asymm.*, **12**, 1395 (2001)
- [187] K. Cabrera, D. Lubda, *J. Chromatogr. A*, **666**, 433 (1994)
- [188] K. Cabrera, M. Jung, M. Fluck, V. Schurig, *J. Chromatogr. A*, **731**, 315 (1996)
- [189] A. C. Spivey, P. Charbonneau, T. Fekner, D. H. Hochmuth, A. Maddaford, C. Malardier-Jugroot, A. J. Redgrave, M. A. Whitehead, *J. Org. Chem.*, **66**, 7394 (2001)
- [190] L. Li, R. Thompson, J. R. Sowa jr., A. Clausen, T. Dowling, *J. Chromatogr. A*, **1043**, 171 (2004)
- [191] F. Gasparini, L. Lunazzi, D. Misiti, C. Villani, *Acc. Chem. Res.*, **28**, 163 (1995)
- [192] C. Wolf, G. E. Tumambac, *J. Phys. Chem.*, **107**, 815 (2003)
- [193] C. Villani, W. H. Pirkle, *Tetrahedron: Asymm.*, **6**, 27 (1995)
- [194] F. Gasparini, D. Misiti, M. Pierini, C. Villani, *Tetrahedron: Asymm.*, **8**, 2069 (1997)

- [195] J. Oxelbark, S. Allenmark, *J. Org. Chem.*, **64**, 1483 (1999)
- [196] J. Oxelbark, S. Allenmark, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2**, 1587 (1999)
- [197] V. Schurig, W. Bürkle, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7573 (1982)
- [198] W. Bürkle, H. Karfunkel, V. Schurig, *J. Chromatogr.*, **288**, 1 (1984)
- [199] P. J. Marriott, Y.-H. Lai, *J. Chromatogr.*, **447**, 29 (1988)
- [200] F.-G. Klärner, D. Schröer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **26**, 1294 (1987)
- [201] V. Schurig, M. Jung, M. Schleimer, F.-G. Klärner, *Chem. Ber.*, **125**, 1301 (1992)
- [202] D. H. Hochmuth, W. A. König, *Liebigs Ann.*, 947 (1996)
- [203] D. H. Hochmuth, W. A. König, *Tetrahedron: Asymm.*, **10**, 1089 (1999)
- [204] O. Trapp, V. Schurig, *Chem. Eur. J.*, **7**, 1495 (2001)
- [205] M. Jung, V. Schurig, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 529 (1992)
- [206] V. Schurig, F. Keller, S. Reich, M. Fluck, *Tetrahedron: Asymm.*, **8**, 3475 (1997)
- [207] O. Trapp, V. Schurig, *Chirality*, **14**, 465 (2002)
- [208] C. Wolf, D. H. Hochmuth, W. A. König, *Liebigs Ann.*, 357 (1996)
- [209] J. Faimon, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **60**, 2901 (1996)
- [210] M. Orlik, „Reakcje oscylacyjne porządek i chaos”, WNT, Warszawa, 1996
- [211] A. Pechenkin, *Stud. Hist. Philos. M. P.* **33**, 269 (2002)
- [212] P. Ruoff, *Physica D*, **84**, 204 (1995)
- [213] S. Fujieda, Y. Mori, A. Nakazawa, Y. Mogami, *Adv. Space Res.*, **28**, 537 (2001)
- [214] I. Hanazaki, Y. Mori, T. Sekiguchi, G. Rábai, *Physica D*, **84**, 228 (1995)
- [215] P. Gray, S. K. Scott, „Chemical oscillations and instabilities. Non-linear chemical kinetics”, Clarendon Press, Oxford, 1994
- [216] A. M. Turing, *Philos. Trans. R. Soc. London. B Biol. Sci.*, **237**, 37 (1952)
- [217] I. Prigogine, G. Nicolis, „Self-organization in non-equilibrium systems”, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 1977
- [218] I. P. Epstein, J. A. Pojman, „An introduction to nonlinear chemical dynamics”, Oxford University Press, Oxford, 1998
- [219] W. Ebeling, „Strukturbildung bei irreversiblen Prozessen”, Teubner, Leipzig, 1976
- [220] Y. Kuramoto, *Physica*, **106**, 128 (1981)
- [221] J. Masełko, *J. Phys. Chem.*, **99**, 2949 (1995)
- [222] R. Bhushan, V. Parshad, *J. Chromatogr. A*, **721**, 369 (1996)
- [223] R. Bhushan, G. P. Reddy, S. Joshi, *J. Planar Chromatogr.*, **7**, 126 (1994)
- [224] L. Cecchi, P. Malaspina, *Anal. Biochem.*, **192**, 219 (1991)
- [225] H.C. Freeman, J.E.W.L. Smith, and J.C. Taylor, *Acta Cryst.*, **14**, 407 (1961)

- [226] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976)
- [227] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, Ł. Wojtal, G. Grygierczyk, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **18**, 226 (2007)
- [228] M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, M. Leda, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, I. R. Epstein, *J. Phys. Org. Chem.*, **23**, 1066 (2010)
- [229] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **21**, 151 (2009)
- [230] P.W. Atkins, „*Chemia fizyczna*”, PWN, Warszawa, 2001
- [231] M. Sajewicz, T. Kowalska, *Chromat. Res. Int.*, **2011**, 957508 (2011)
- [232] P. V. Ivanov, V. I. Maslova, D. N. Golubykh, *Russ. Chem. Bull.*, **46**, 2138 (1997)
- [233] E. A. Chernyshev, P. V. Ivanov, D. N. Golubykh, *Russ. Chem. Bull.*, **50**, 1998 (2001)
- [234] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, T. Kowalska, *J. Sys. Chem.*, **1**, 7 (2010)
- [235] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, M. Wróbel, R. Piętka, T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr. - Modern TLC*, **22**, 241 (2009)
- [236] M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **21**, 259 (2009)
- [237] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, E. Berry, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* (przyjęty do druku)
- [238] M. Sajewicz, M. Gontarska, M. Wróbel, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **30**, 2193 (2007)
- [239] H. Y. Aboul-Enein, M. I. El-Awady, C. M. Heard, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32**, 1055 (2003)
- [240] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr. - Modern TLC*, **21**, 349 (2008)
- [241] M. Sajewicz, G. Grygierczyk, M. Gontarska, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **30**, 2185 (2007)
- [242] M. Sajewicz, H.-E. Hauck, G. Drabik, E. Namysło, B. Głód, T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC*, **19**, 278 (2006)
- [243] M. Sajewicz, M. Gontarska, A. Dąbrowa, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **30**, 2369 (2007)
- [244] The British Pharmacopoeia, The Pharmaceutical Press, London (2002)
- [245] K. Florey, “*Analytical Profiles of Drug Substances*”, Academic Press, London (1981)

- [246] M. Matlengiewicz, M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **22**, 81 (2010)
- [247] M. Sajewicz, R. Wrzalik, M. Gontarska, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I. R. Epstein, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **32**, 1359 (2009)
- [248] V. Vanag, I. R. Epstein, *Science*, **294**, 836 (2001)
- [249] L. Yang, M. Dolnik, A. M. Zhabotinsky, I. R. Epstein, *Phys. Rev. Lett.*, **88**, 2088303 (2002)
- [250] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, E. Berry, T. Kowalska, *J. Chromatogr. Sci.* (złożony do druku)
- [251] M. Sajewicz, M. Gontarska, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I. R. Epstein, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **31**, 1896 (2008)
- [252] E. Peacock-Lopez, D. B. Radow, C. S. Flesner, *Biophys. Chem.*, **65**, 171 (1997)
- [253] L. L. Tsai, G. R. Hutchinson, E. Peacock-Lopez, *J. Chem. Phys.*, **113**, 2003 (2000)
- [254] T. Tjivikua, P. Ballester, J. Rebek, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1249 (1990)
- [255] A. M. Turing, *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, **B237**, 37 (1952)
- [256] D. G. Blackmond, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **101**, 5732 (2004)
- [257] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC*, **21**, 43 (2008)
- [258] M. Sajewicz, D. Kronenbach, D. Staszek, M. Wróbel, G. Grygierczyk, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **31**, 2006 (2008)
- [259] R. Plasson, H. Bersini, A. Commeyras, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **101**, 16733 (2004)
- [260] C. Hyver, *J. Chem. Phys.*, **83**, 850 (1985)
- [261] V. I. Bykov, A. N. Gorban, *Chem. Eng. Sci.*, **42**, 1249 (1987)

10. Życiorys

Imię i nazwisko: Monika Gontarska
Data i miejsce urodzenia: 28.09.1983, Katowice
Stan cywilny: panna
Adres zamieszkania: ul. Wczasowa 16/6, 40-694 Katowice

Wykształcenie:

Od 2007: słuchaczka Studium Doktoranckiego przy Instytucie Fizyki
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
2002-2007 Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Mat-Fiz-Chem,
kierunek: chemia
Specjalność: Fizykochemiczne metody w ocenie środowiska
1998–2002 VII Liceum Ogólnokształcące im. Harcerzy Obrońców
Katowic w Katowicach

Doświadczenie zawodowe:

2007 Rozpoczęcie stacjonarnych studiów doktoranckich na
Uniwersytecie Śląskim w Katowicach, dyscyplina: Chemia
2008-2011 Przyznanie stypendium doktoranckiego w ramach projektu
„Uniwersytet Partnerem Gospodarki Opartej na Wiedzy”
(UPGOW) współfinansowanego przez Unię Europejską
w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (EFS)
2008-2010 Umowa o pracę z Uniwersytetem Śląskim na stanowisku
asystenta naukowo-dydaktycznego w Zakładzie Chemii
Ogólnej i Chromatografii Instytutu Chemii na Wydziale
Matematyki, Fizyki i Chemii
2009-2011 Przyznanie stypendium za wyniki w nauce w ramach
studiów doktoranckich

11. Lista prac własnych tematycznie związana z rozprawą doktorską

1. "Enantioseparation of *S,R*-(±)-ketoprofen on plain silica gel layers with achiral mobile phase"
M. Sajewicz, G. Grygierczyk, **M. Gontarska**, T. Kowalska
Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **30**, 2185-2192 (2007)
2. "Enantioseparation and oscillatory transenantiomerization of *S,R*-(±)-ketoprofen, as investigated by means of thin layer chromatography with densitometric detection"
M. Sajewicz, **M. Gontarska**, M. Wróbel, T. Kowalska
Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **30**, 2193-2208 (2007)
3. "Study on the oscillatory *in vitro* transenantiomerization and enantioseparation of the flurbiprofen antimers by means of thin layer chromatography (TLC)"
M. Sajewicz, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, Ł. Wojtal, G. Grygierczyk, T. Kowalska
Acta Chromatographica, **18**, 226-237 (2007)
4. "Thin-layer chromatographic and polarimetric investigation of the oscillatory *in vitro* chiral inversion of *S*-(+)-ketoprofen"
M. Sajewicz, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, T. Kowalska
Journal of Planar Chromatography - Modern TLC, **21**, 349-353 (2008)
5. "On the spontaneous abiotic peptization of phenylglycine in an aqueous medium"
M. Sajewicz, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, T. Kowalska
Acta Chromatographica, **21**, 151-160 (2009)
6. "*In vitro* chiral conversion, phase separation, and wave propagation in aged profen solutions"
M. Sajewicz, R. Wrzałik, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, T. Kowalska
Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **32**, 1359-1372 (2009)
7. "TLC in a search for structural limitations of spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion. α -Hydroxybutyric and mandelic acids"
M. Sajewicz, D. Kronenbach, **M. Gontarska**, M. Wróbel, R. Piętka, T. Kowalska
Journal of Planar Chromatography - Modern TLC, **22**, 241-248 (2009)
8. "On the spontaneous condensation of selected hydroxy acids"
M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, D. Kronenbach, **M. Gontarska**, T. Kowalska
Acta Chromatographica, **21**, 259-271 (2009)

9. "On the spontaneous condensation of profens, with ketoprofen as an example"
M. Matlengiewicz, M. Sajewicz, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, T. Kowalska
Acta Chromatographica, **22**, 81-90 (2010)
10. "Spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion of simple carboxylic acids and its possible mechanism"
M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, M. Leda, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, T. Kowalska, I. R. Epstein
Journal of Physical Organic Chemistry, **23**, 1066-1073 (2010)
11. "Condensation oscillations in the peptization of phenylglycine"
M. Sajewicz, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, I.R. Epstein, T. Kowalska
Journal of Systems Chemistry, **1**, 7-22 (2010)
12. "Condensation oscillations in the condensation of mandelic acid"
M. Sajewicz, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, E. Berry, T. Kowalska
Acta Chromatographica (przyjęty do druku)
13. "An HPLC-DAD and LC-MS study of condensation oscillations with *S*-(+)-ketoprofen dissolved in acetonitrile"
M. Sajewicz, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, E. Berry, T. Kowalska
Journal of Chromatographic Science (złożony do druku)

12. Lista publikacji konferencyjnych tematycznie związana z rozprawą doktorską

1. "A study on the ability of ketoprofen to oscillatory transenantiomerization" (poster)
M. Sajewicz, **M. Gontarska**, M. Wróbel, T. Kowalska
49 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego
Gdańsk (Polska), 18-22.09.2006
2. "On the spontaneous oscillatory transenantiomerization and thin layer chromatographic enantioseparation of the *S*-(+)- and *R*-(-)-flurbiprofen antimers" (poster)
M. Sajewicz, G. Grygierczyk, **M. Gontarska**, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, T. Kowalska
XXXI Sympozjum Naukowe nt. "Chromatograficzne metody badania związków organicznych", Katowice-Szczyrk (Polska), 4-6.06.2007
3. "Investigation of a spontaneous in vitro structural inversion of *S*-(+)- and *R*-(-)-flurbiprofen by means of polarimetry and thin layer chromatography (TLC)" (poster)
M. Sajewicz, G. Grygierczyk, **M. Gontarska**, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, T. Kowalska
13th International Symposium on Separation Sciences
Strbske Pleso (Słowacja), 27-29.06.2007
4. "On an impact of strinning on profen solution. Low reliability of chromatographic quantification of the pure profen enantiomers and their scalemic mixtures" (poster)
M. Sajewicz, **M. Gontarska**, T. Kowalska
7th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods
Siófok (Węgry), 5-7.09.2007
5. "On an in vitro oscillatory chiral inversion of profen drugs and on its several implications" (poster)
M. Sajewicz, G. Grygierczyk, **M. Gontarska**, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, T. Kowalska
1th International Conference on Drug Design & Discovery
Dubai (Zjednoczone Emiraty Arabskie), 4-7.02.2008
6. "Investigation of the spontaneous oscillatory in vitro chiral inversion of *S*-(+)-ketoprofen" (poster)
M. Sajewicz, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, T. Kowalska
19th International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis
Gdańsk (Polska), 8-12.06.2008

7. "On spontaneous oscillatory chiral conversion of different carboxylic acids in aqueous media" (poster)
M. Sajewicz, M. Leda, M. Matlengiewicz, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, M. Wróbel, A. Sekuła, T. Kowalska, I.R. Epstein
XXXII Sympozjum Naukowe nt. "Chromatograficzne metody badania związków organicznych", Katowice-Szczyrk (Polska), 3-5.06.2009
8. "Experimental evidence of a spontaneous condensation of profens, amino acids and hydroxyl acids in aqueous ethanol" (poster)
M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, D. Kronenbach, **M. Gontarska**, A. Noworzyn, A. Ostrowska, T. Kowalska
XXXII Sympozjum Naukowe nt. "Chromatograficzne metody badania związków organicznych", Katowice-Szczyrk (Polska), 3-5.06.2009
9. "A Study on the Impact of the Different Carbon Atom Chain Lengths with Chiral Aliphatic Carboxylic Acids on the Course of Spontaneous Oscillatory Steric Conversion Running *In-Vitro*" (poster)
M. Sajewicz, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, M. Wróbel, T. Kowalska
8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods
Siófok (Węgry), 2-4.09.2009
10. "On generality of spontaneous oscillatory chiral conversion in abiotic aqueous media with different carboxylic acids" (poster)
M. Sajewicz, M. Leda, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, T. Kowalska, I.R. Epstein
12th European Symposium on Organic Reactivity, Haifa (Izrael), 6-11.09.2009
11. "Experimental evidence of a spontaneous condensation of amino acids and hydroxy acids in aqueous ethanol" (poster)
M. Sajewicz, D. Kronenbach, **M. Gontarska**, T. Kowalska
12th European Symposium on Organic Reactivity, Haifa (Izrael), 6-11.09.2009
12. "Badanie oscylacyjnej inwersji chiralnej *in vitro* enancjomerów kwasu migdałowego" (poster)
M. Sajewicz, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, T. Kowalska
II Ogólnopolskie Sympozjum nt. "Nowoczesne techniki badawcze w ocenie jakości produktów leczniczych", Lublin (Polska), 24-25.09.2009

13. "On Spontaneous Oscillatory Condensation of *S*-(+)-Ketoprofen In Acetonitrile" (poster)
M. Sajewicz, M. Leda, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, E. Berry, I.R. Epstein,
T. Kowalska
XXXIII Sympozjum Naukowe nt. "Chromatograficzne metody badania związków organicznych", Katowice-Szczyrk (Polska), 25-27.05.2010
14. "On Spontaneous Oscillatory Condensation of Phenylacetic Acids in Aqueous Ethanol" (poster)
M. Sajewicz, M. Leda, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, E. Berry, I.R. Epstein,
T. Kowalska
XXXIII Sympozjum Naukowe nt. "Chromatograficzne metody badania związków organicznych", Katowice-Szczyrk (Polska), 25-27.05.2010
15. "Experimental evidence of a spontaneous condensation of phenylglycine and mandelic acid in abiotic aqueous media" (poster)
M. Sajewicz, M. Leda, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, E. Berry, I.R. Epstein,
T. Kowalska
5th Congress of Pharmacists of Serbia, Belgrad (Serbia), 13-17.10.2010
16. "Experimental evidence of a spontaneous condensation of ketoprofen dissolved in acetonitrile" (poster)
M. Sajewicz, M. Leda, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, E. Berry, I.R. Epstein,
T. Kowalska
5th Congress of Pharmacists of Serbia, Belgrad (Serbia), 13-17.10.2010
17. "Non-linear oscillations and polycondensations of selected carboxylic acids" (wykład)
M. Sajewicz, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, T. Kowalska
Minisymposium Naukowe (Oddział Katowicki Polskiego Towarzystwa Chemicznego)
nt. "Chemicznej Dynamiki Nieliniowej", Katowice (Polska), 19.11.2010
18. "Experimental evidence of *in vitro* oscillatory chiral inversion and polycondensation with selected chiral carboxylic acids" (poster)
M. Sajewicz, **M. Gontarska**, D. Kronenbach, T. Kowalska
International Conference on Chemistry: Frontiers and Challenges, Aligarh (Indie), 5-6.03.2011

Enantioseparation of *S,R*-(±)-Ketoprofen on Plain Silica Gel Layers with Achiral Mobile Phase

**Mieczysław Sajewicz, Gabriela Grygierczyk, Monika Gontarska,
and Teresa Kowalska**

Institute of Chemistry, Silesian University, Katowice, Poland

Abstract: In an earlier study, we provided sufficient experimental evidence in favor of the hypothesis that—contrary to the conviction widespread among the practitioners of thin layer chromatography (TLC)—silica gel used for the coating of chromatographic plates is not amorphous, but microcrystalline and chiral. This evidence was procured both by the spectroscopic measurements of the circular dichroism of the binder-free silica gel samples (manufactured specially for coating of the TLC plates) and by TLC measurements with densitometric detection. From the chromatographic measurements, it was found that silica gel employed in the planar chromatographic mode enables two-dimensional enantioseparation of the racemic (or scalemic) mixtures of the selected test profens in the one-dimensional development mode, without using chiral mobile phases.

In our present study, this striking ability of the silica gel layers is further investigated with one more racemic mixture from the group of profens [i.e., *S,R*-(±)-ketoprofen]. Good separation was obtained of the racemic ketoprofen mixture on the chromatographic plates precoated with the plain silica gel, when using the achiral binary mobile phase acetonitrile-water (5:1, v/v) plus several drops of glacial acetic acid. In this case, three different components of the investigated mixture were found, similar to the case observed earlier, when using a silica gel layer impregnated with L-arginine. These three components were separated two-dimensionally in the one dimensional development mode, i.e., their positions differed in terms of the R_F values and, moreover, the respective migration tracks of these three species all deviated to the right. It seems justified to conclude that the two-dimensional enantioseparation in the one-dimensional planar chromatographic mode on the microcrystalline silica gel layers is a promising option, enhancing the enantioseparative potential

Address correspondence to Teresa Kowalska, Institute of Chemistry, Silesian University, Katowice, Poland. E-mail: kowalska@us.edu.pl

of planar chromatography that cannot be challenged by the column liquid chromatography.

Keywords: *S,R*-(\pm)-Ketoprofen, TLC, Chirality, Chiral silica gel, Two-dimensional enantioseparation, Racemic mixtures

INTRODUCTION

In our earlier studies, we have reported on the chirality of microcrystalline silica gel used as a stationary phase in thin layer chromatography (TLC), as confirmed by the results of circular dichroism (CD) spectroscopy.^[1] To our best knowledge, this was the first written report on this particular issue, available from a scientific source. Moreover, in publications^[1,2] we have also reported on the deviations of the selected profens' migration tracks from the straight-line verticality (observed in the ascending development mode). With *S,R*-(\pm)-ibuprofen and *S,R*-(\pm)-naproxen, one enantiomer deviated to the left and the respective antimer deviated to the right.^[1,2] This phenomenon has been observed both on the plain silica gel layers and on those impregnated with a chiral selector (i.e., L-arginine). In another paper^[3] we presented the results of an analogous study with *S,R*-(\pm)-ketoprofen used as the chiral test analyte. In that case, the chiral chromatographic system was used with L-arginine as the chiral impregnant of the silica gel layer. As a result, we observed three (instead of the expected two) well separated species, with their migration tracks all deviating to the right. The ultraviolet (UV) spectra, run in situ for each individual separated band, were identical. Identification of these three species proved quite problematic.

In order to progress with our study on the chirality of the plain silica gel layers and to further explore their practical potential for enantioseparations, in this work, we examined the possibility to two-dimensionally separate the racemic ketoprofen mixture on plain silica gel layers in the one-dimensional TLC mode.

EXPERIMENTAL

S,R-(\pm)-Ketoprofen

In our study, we used *S,R*-(\pm)-ketoprofen, manufactured by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA; cat. # K1751-5G). The manufacturer declared its purity at the $\geq 98\%$ level. We additionally examined the *S,R*-(\pm)-ketoprofen sample originating from our batch for its purity by means of HPLC, ^1H NMR, and ^{13}C NMR, and its analytical grade was fully confirmed. The sample for the TLC study was prepared as a solution in 70% ethanol, its concentration being equal to 0.1 mg mL^{-1} (i.e., ca. $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). This considerably low

concentration of the employed sample proved sufficient for densitometric detection at the UV wavelength of 252 nm, due to cumulation of the two phenyl groups and one carbonyl (C=O) chromophore in the ketoprofen molecule.

Sample application to the plates was automatic, with use of a Model AS 30 autosampler manufactured by Desaga, Heidelberg, Germany. The *S,R*-(±)-ketoprofen solutions were applied to the plate 1.5 cm above the lower edge in the aliquots of 5 mL spot^{-1} . Nine samples in the equal distance of 2 cm from one another and from the side edges of the plate were applied, and then the chromatogram was developed in the one-dimensional mode.

TLC Silica Gel Layers

TLC was performed on commercial glass plates (20 cm × 20 cm) precoated with 0.25 mm layers of silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany, cat. # 1.05715). Before use, the plates were washed by predevelopment with methanol-water (9:1, v/v), and then dried at ambient temperature for 3 h.

Mobile Phase and Development of the Chromatograms

Development of the *S,R*-(±)-ketoprofen samples was carried in the normal (after Stahl) chromatographic tanks in the ascending mode, after their saturation for 0.5 h. It was carried out to a distance of 15 cm using the binary mobile phase acetonitrile (ACN)-water (H_2O) (5:1, v/v) plus several drops of glacial acetic acid to fix the pH < 4.8.

After development of the chromatograms, the plates were dried at ambient temperature for 3 h, and the surface of each plate was densitometrically scanned in the 1-mm intervals in the direction of developing the chromatograms.

The chromatographic experiment was carried out on three plates, with nine equal aliquots of the *S,R*-(±)-ketoprofen sample spotted per plate. Thus, the numerical results given in this paper originate from 27 individual development lanes, as it was our aim to most reliably assess the deviation from verticality of the migration tracks with the constituents of the investigated racemic mixture.

Densitometric Assessment of the Chromatograms

Densitograms were acquired for each chromatogram in the 1-mm intervals with a Desaga Model CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible Pro Quant software. Concentration profiles were recorded in UV light from the deuterium lamp (in the reflectance mode) at 252 nm. The dimensions of

the rectangular light beam were $2.0\text{ mm} \times 0.1\text{ mm}$. The maxima of the concentration profiles were used for calculation of R_F values.

Moreover, the UV spectra were recorded in situ of the three chromatographic spots derived from the *S,R*-(\pm)-ketoprofen sample in the course of its separation on the plain silica gel layer.

RESULTS AND DISCUSSION

At the preliminary stage of our experiments, we checked the evenness and strict horizontality of the laboratory bench top with a spirit level, in order to eliminate the non-chromatographic external factors that might negatively affect our results. We also eliminated a possibility of cool air drafts in our laboratory, which might also contribute to the deviation of the enantiomers' migration tracks from verticality. In that way, we believe to have entirely excluded the influence of the non-chirality-based factors on the ultimate measuring results.

Similar to our earlier experimental evidence,^[3] we again found three well separated spots originating from the *S,R*-(\pm)-ketoprofen sample; their respective migration tracks deviated from the strict verticality to the right, and these deviations were not random, but systematic (see Figure 1). The

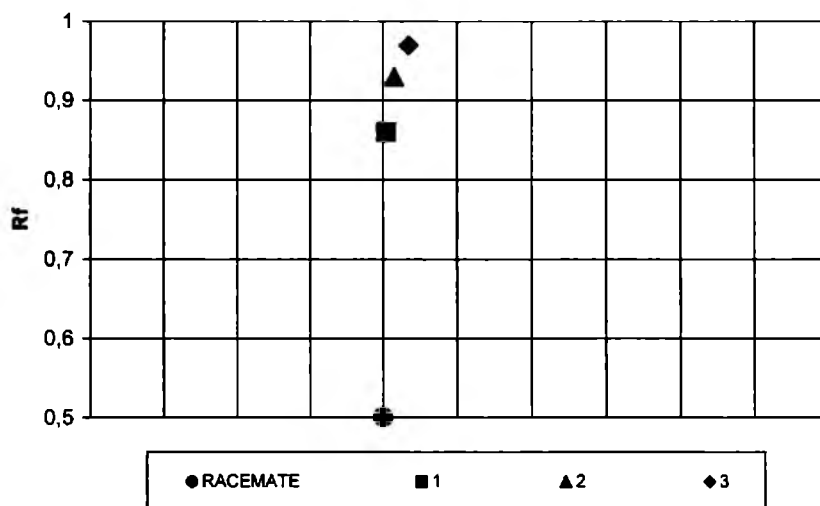


Figure 1. Schematic presentation of the right-handed deviation from verticality of the migration tracks of the three chromatographic spots derived from the same *S,R*-(\pm)-ketoprofen sample. The respective deviation values were: $1(\pm 1)$ mm ($R_F = 0.86$), $3(\pm 1)$ mm ($R_F = 0.93$), and $7(\pm 1)$ mm ($R_F = 0.97$). Stationary phase: silica gel 60 F_{254} (precoated plates, Merck, cat. # 1.05715). Mobile phase: ACN – H_2O (5:1, v/v) plus several drops of glacial acetic acid.

magnitude of the deviations was, in the two out of the three cases, considerably higher than is normal in random cases (then it hardly surpasses ± 1 mm), and for the separated spots it was equal to 1 (± 1) mm ($R_F = 0.86 \pm 0.02$), 3 (± 1) mm ($R_F = 0.93 \pm 0.02$), and 7 (± 1) mm ($R_F = 0.97 \pm 0.02$). This result is comparable to the phenomenon observed on the L-arginine-impregnated silica gel layers in terms of direction and more pronounced in terms of magnitude.^[3] Positions of the three spots on the chromatogram were perceptibly different from one another and higher than the maximum error of the technique (usually assumed as not higher than $\pm 0.02 R_F$ units).

A comparison of separation of the three species on the impregnated^[3] and the non-impregnated layers allows the following conclusions. The R_F values observed on the L-arginine-impregnated silica gel layers were equal to 0.58 ± 0.02 , 0.69 ± 0.02 , and 0.75 ± 0.02 , respectively, and hence considerably lower than in the case of the plain silica gel. Also, the R_F differences (ΔR_F) between the spots with the lowest and the highest R_F value were, in the former case, greater than in the latter one. Thus, it can be deduced that the chiral selector (L-arginine) and the chiral microcrystalline silica gel contribute jointly to the vertical separation of the spots, whereas the chirality of the silica gel layer is the predominant factor responsible for the horizontal separation.

In order to find out about the nature of these three separated spots, we recorded their in situ respective UV spectra, as shown in Figure 2. In each case, the observed maximum was at the wavelength $\lambda_{\max} \approx 252$ nm, which remains in conformity with the data taken from the literature and to the ketoprofen spectra recorded in the aqueous, acetonitrile, or alcohol solutions (λ_{\max} was in these cases equal to 254 or 255 nm).^[4,5] Both the shapes of the three recorded in situ spectra and the position of their maximum were identical, the only difference being their relative intensities (most evidently due to the different aliquots of the species per separated spot). The analogous UV spectra are presented in an earlier paper,^[3] as recorded for the three constituents of the *S,R*-(\pm)-ketoprofen sample separated in the chiral TLC system with the L-arginine-impregnated silica gel stationary phase. We believe that, in both cases—in that of the silica gel layers impregnated with L-arginine^[3] and in the present one of the plain silica gel layers—the chemical nature of these three components is the same. It is hard to judge their chemical nature, and some cautious speculations on this subject were offered in publication,^[3] so we are not going to extensively repeat them now. It will only be said that two alternative options were suggested. According to option 1, the following three fractions of the cyclic dimers could have been separated: *RR* (the lowest), *SR* (the medium), and *SS* (the highest). According to option 2, the following chemical nature might be alternatively attributed to each of the three fractions: keto-enol tautomer derived from ketoprofen (the lowest), *SR* (the medium), and *SS* (the highest). At the moment, it is virtually not possible to experimentally verify these

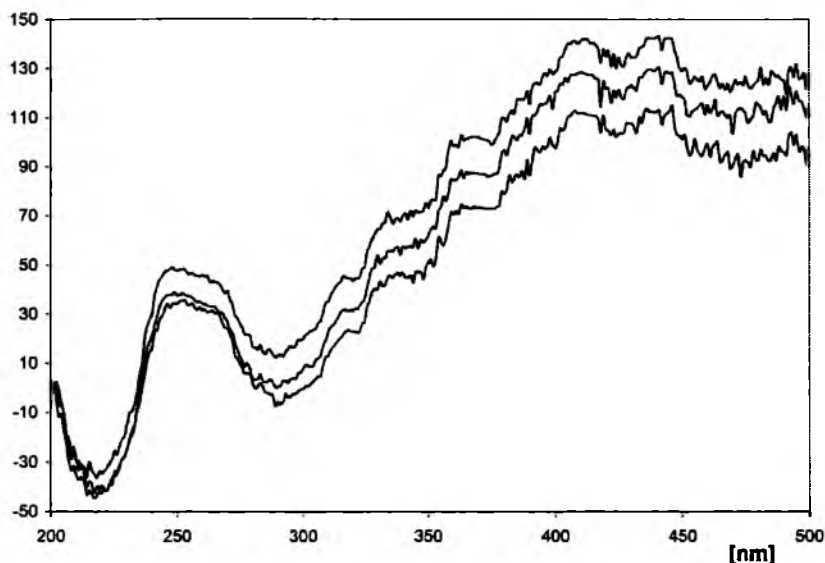


Figure 2. The UV spectra (recorded in situ on the chromatographic plate) of the three chromatographic spots derived from the same *S,R*-(\pm)-ketoprofen sample and all showing the right-handed deviation from verticality of their respective migration tracks (see Figure 1).

speculations, and it also has to be assumed that still another possibility might prove correct.

Finally, a comparison can be made of the results presented in papers^[1–3] and in this one. In papers,^[2,3] we enantioseparated the selected profens (i.e., ibuprofen, naproxen, ketoprofen, and 2-phenylpropionic acid) in the chiral thin layer chromatographic systems with silica gel layers impregnated with a chiral selector (i.e., L-arginine). In all those cases enantioseparation was two-dimensional, which means that the two antimers showed both different R_F values (enantioseparation in the vertical direction) and deviation of their respective migration tracks from verticality (enantioseparation in the horizontal direction).

In paper^[1] and in the present paper we studied retention of the selected profens (i.e., *S*-(+)-ibuprofen, *S*-(+)-naproxen, and *S,R*-(\pm)-ketoprofen) when developed in TLC systems with plain silica gel layers and an achiral mobile phase. In the case of *S*-(+)-ibuprofen and *S*-(+)-naproxen, the well pronounced deviation from verticality of their respective migration tracks was observed. In the case of *S,R*-(\pm)-ketoprofen (discussed in this paper), we again observed the well pronounced deviation from verticality of the three ketoprofen sample constituents and their two-dimensional separation. Using the example of *S,R*-(\pm)-ketoprofen, we can firmly conclude that the plain silica gel layer can provide a successful two-dimensional separation of certain racemic (or scalemic) mixtures in the one-dimensional development mode.

CONCLUSIONS

Based upon the results with respect to the profens enantioseparated on the silica gel layers impregnated and not impregnated with the chiral selector, the following general conclusions can be drawn:

- In the case of the silica gel layers impregnated with the chiral selector (i.e., L-arginine), the two-dimensional enantioseparation in the one-dimensional development mode was observed. Namely, the antipodes were simultaneously undergoing vertical separation (manifested by the difference of the R_F values) and horizontal separation (manifested by the deviation from the verticality of their migration tracks).
- In the case of the plain silica gel layers (i.e., not impregnated with the chiral selector) and the achiral mobile phase, the two-dimensional separation of the racemic mixture in the one-dimensional development mode was also observed. However, the extent of the vertical separation was, in the case of the plain silica gel layers, lower and the respective R_F values were higher than in the case of the silica gel layers with the chiral selector (L-arginine) deposited on its surface. The extent of the horizontal separation was, in the case of the plain silica gel layer, perceptibly higher than on the L-arginine-impregnated silica gel plates.
- Vertical enantioseparation in the TLC mode seems due to the joint action of the microcrystalline silica gel layer and of the chiral selector deposited on its surface, whereas horizontal enantioseparation seems predominantly due to the action of the microcrystalline silica gel layer.
- It is evident that the benefit of the two-dimensional enantioseparation in the one-dimensional development mode is inherent exclusively of planar chromatography. Even if intermolecular interactions between the chiral analyte and the chiral stationary phase take place in column chromatography also, it is due to the effective diffusion perpendicular to the direction of the mobile phase flow that the analyte molecules migrate sidewise (and the effective diffusion perpendicular to the direction of the mobile phase flow is absent from the column chromatography).

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank Merck KGaA (Darmstadt, Germany) for supplying the TLC plates used in our experiments.

REFERENCES

1. Sajewicz, M.; Hauck, H.-E.; Drabik, G.; Namysło, E.; Głód, B.; Kowalska, T. Tracing possible structural asymmetry of silica gel used for precoating thin-layer chromatography plates. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* **2006**, *19*, 278–281.

2. Sajewicz, M.; Piętko, R.; Drabik, G.; Namysło, E.; Kowalska, T. On the stereochemically peculiar two-dimensional separation of 2-arylpropionic acids by chiral TLC. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* **2006**, *19*, 273–277.
3. Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Wróbel, M.; Kowalska, T. Enantioseparation and oscillatory transesterification of *S,R*-(±)-ketoprofen, as investigated by means of thin layer chromatography with densitometric detection. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2007**, *30* (15), 2193–2208.
4. *The British Pharmacopoeia*; The Pharmaceutical Press: London, 2002, 1003–1004.
5. Liversidge, G.G. Ketoprofen. In *Analytical Profiles of Drug Substances*; Florey, K., Ed.; Academic Press: London, 1981; 443–471.

Received November 21, 2006

Accepted December 18, 2006

Manuscript 6104H

Enantioseparation and Oscillatory Transenantiomerization of *S,R*-(\pm)- Ketoprofen, as Investigated by Means of Thin Layer Chromatography with Densitometric Detection

**Mieczysław Sajewicz, Monika Gontarska, Magdalena Wróbel,
and Teresa Kowalska**
Institute of Chemistry, Silesian University, Katowice, Poland

Abstract: In the course of our earlier and rather extensive investigations, we discovered a striking ability of the two non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) from the group of 2-arylpropionic acids (2-APAs), i.e., ibuprofen and naproxen, and also of 2-phenylpropionic acid (which is not a drug) to, in vitro, undergo a repeated structural conversion from one chiral configuration to the opposite one. We labelled the discovered phenomenon ‘oscillatory transenantiomerization’ and formulated a hypothesis that all the 2-APAs can behave in a similar manner when dissolved in certain low-molecular-weight (aqueous or non-aqueous) solvents. Furthermore, we assumed that structural differences among the various 2-APAs can result in differentiated dynamics of oscillatory transenantiomerization, which is omnipresent with this class of compounds. In this paper, we present the results of an analogous study, this time devoted to still another 2-APA, *S,R*-(\pm)-ketoprofen. The chemical structure of ketoprofen is, in a sense, unique as a keto-enol tautomer (a transition form between *S*-(+)-ketoprofen and its *R*-(-) antimer) that contains a long assembly of eight conjugated π -electron pairs. Such a peculiar electron structure seems to particularly well stabilize the keto-enol tautomer derived from ketoprofen and, consequently, to efficiently promote oscillatory transenantiomerization of this compound. The results of our investigations fully confirmed this intuition, and in our thin-layer chromatographic experiment, we managed to demonstrate the ability of *S,R*-(\pm)-ketoprofen to undergo oscillatory transenantiomerization, in a manner similar to that of the other already examined 2-APAs. Moreover, we performed a successful densitometric scrutiny of the chromatograms of *S,R*-(\pm)-ketoprofen, proved to have separated three different

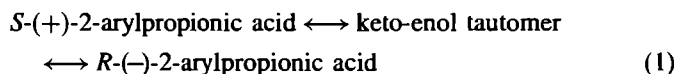
Address correspondence to Teresa Kowalska, Institute of Chemistry, Silesian University, Katowice, Poland. E-mail: kowalska@us.edu.pl

species, to run, in situ, their respective UV spectra (all three of them practically identical), and to speculate about their chemical nature. In the HPLC experiment we produced evidence of a considerable viscosity of *S,R*-(±)-ketoprofen when chromatographed with pure acetonitrile and with the acetonitrile + water mixtures (containing very low amounts of water). This viscosity seems to be the main factor that contributes to the oscillatory (i.e., repeated) nature of the observed transesterification.

Keywords: *S,R*-(±)-Ketoprofen, TLC, Chirality, Oscillatory transesterification, UV absorption spectra, Viscosity

INTRODUCTION

In our earlier articles^[1-3] we presented the results of our discovery that the selected 2-arylpropionic acids (2-APAs), when dissolved in low-molecular-weight aqueous and non-aqueous solvents, can undergo a repeated conversion of their chiral configuration, labelled by us 'oscillatory transesterification'. Two facts were striking about these results: (i) that 2-APAs can undergo chiral conversion not only in vivo (which is a widely described phenomenon in biochemical and pharmaceutical papers), but also in vitro; and (ii) that this conversion is of an oscillatory nature. Schematically, such conversion is shown in the following scheme:



Obviously, oscillatory transesterification of an optically pure enantiomer is a driving force pushing the whole system toward racemization, as schematically shown in Fig. 1. Upon obtaining these initial results, two important questions arose, namely: (i) one referring to the molecular mechanism of transesterification, and (ii) the second referring to the factor generating the oscillatory (i.e., repeated) mechanism thereof.

From the theory of molecular mechanisms in organic reactions, it is well known that a basic environment can catalyze formation of the keto-enol tautomers, whereas an acidic one usually tends to hamper this process. We performed an experiment in which we stored the selected optically pure 2-APAs both in a basic and an acidic environment. In the basic environment, the racemization process went quite rapidly, while in the acidic environment, it did not take place at all.^[4] Thus, we made sure that the mechanism responsible for conversion of the steric configuration of the investigated 2-APAs is via the keto-enol tautomerism.

Among the known factors responsible for generating oscillatory chemical reactions, the effect of gelation (i.e., of an increased viscosity of a given solution, as compared with that of the pure solvent) is usually placed first. Once the rate of formation of an intermediate product in a given multi-step reaction surpasses that of its diffusion in a given system, the

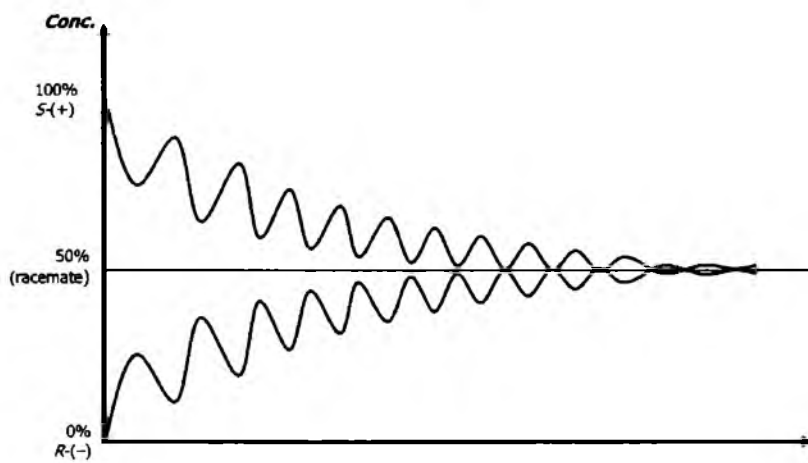


Figure 1. Schematic presentation of the oscillatory transenantiomerization of a given *S*-(+)-2-APA to the *R*-(−) antipode form; the oscillatory plots mirror fluctuations in the decrease of concentration of the *S*-(+) species and the corresponding fluctuations in the increase of concentration of the *R*-(−)-species.

mandatory precondition of an oscillatory reaction is fulfilled. In a study reported earlier,^[5] we managed to demonstrate the gelating ability of the selected 2-APAs.

Even if we anticipate that oscillatory transenantiomerization is a common phenomenon among all 2-APA solutions, we are well aware of the fact that the dynamics of this process can considerably differ from one compound to another, depending on the respective molecular structures. For this reason, we decided to focus our attention in this study on ketoprofen, a very popular NSAID having the molecular structure shown in Figure 2.

The chemical structure of ketoprofen is, in a sense, unique, as its keto-enol tautomer (an anticipated transition form between *S*-(+)-ketoprofen and its *R*-(−) antimer) contains a long assembly of eight conjugated π -electron pairs (see Figure 3). Such a peculiar electron structure seems to considerably stabilize the keto-enol tautomer derived from ketoprofen and,

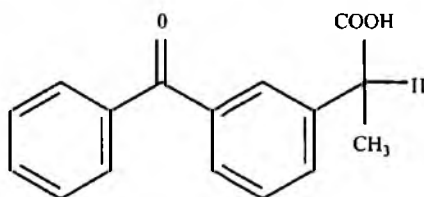


Figure 2. Chemical structure of the ketoprofen molecule.

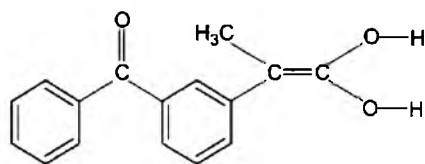


Figure 3. Chemical structure of the keto-enol tautomer derived from ketoprofen.

consequently, to efficiently promote the oscillatory transesterification of this compound.

In the following sections of this paper, we present the results of our study on the ability of *S,R*-(±)-ketoprofen (the commercially available racemate) to undergo oscillatory transesterification. The results obtained clearly point out that, in spite of the racemic form, ketoprofen solution remains in the state of dynamic equilibrium with continuously changing quantitative proportions between the two enantiomers of this compound.

EXPERIMENTAL

S,R-(±)-Ketoprofen

In our study, we used *S,R*-(±)-ketoprofen, manufactured by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA; cat. # K1751-5G). In the thin-layer chromatographic experiments we used a solution of *S,R*-(±)-ketoprofen in 70% ethanol, its concentration equal to 0.1 mg mL⁻¹ (i.e., ca. 3 × 10⁻⁴ mol L⁻¹). In the high performance liquid chromatographic experiments, we used a solution of *S,R*-(±)-ketoprofen in acetonitrile (ACN), its concentration equal to 1 mg mL⁻¹ (i.e., ca. 3 × 10⁻³ mol L⁻¹). In the polarimetric experiment we used a solution of *S,R*-(±)-ketoprofen in 70% ethanol, its concentration being equal to 0.05 g mL⁻¹.

Polarimetric Measurements of the Specific Rotation [α]_D

Measurements of the specific rotation ([α]_D) of the *S,R*-(±)-ketoprofen solution in 70% ethanol were carried out at 22 ± 2°C for 180 min (in 15-min intervals) with use of a Polamat A model polarimeter (manufactured by Carl Zeiss, Jena, Germany). The optical path length of the employed measuring cell was exactly 10 cm (=1 dm), and its volume was ca. 1 mL. Specific rotation [α]_D was calculated, using the following standard equation:

$$[\alpha]_D = 100\alpha/cd \quad (2)$$

where α is the measured rotation (in the angle degrees); D is the employed wavelength $\lambda = 589$ nm, which corresponds with the sodium D line; c is the concentration of a given compound in g 100 mL^{-1} solution; and d is the measured sample thickness in dm.

From the literature^[6] it is known that the specific rotation of *S*-(+)-ketoprofen equals $+57.1^\circ$, and that of the *R*-(-) species equals -57.4° .

Commercial TLC Silica Gel Layers and Their Pretreatment

TLC was performed on commercial glass plates (20 cm \times 20 cm) precoated with 0.25 mm layers of silica gel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; cat. # 1.05715). Before use, the plates were carefully washed by predevelopment with methanol-water, 9:1 (v/v), and then dried at ambient temperature for 3 h.

The washed and dried plates were then impregnated with a $3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ solution of L-arginine in methanol by conventional dipping for 2 s. The concentration of the impregnating solution was calculated as that depositing 0.5 g of L-arginine per 50 g of the dry silica gel adsorbent layer. Finally, the washed and impregnated adsorbent layers were ready for chromatography.

Mobile Phase and Development of Thin Layer Chromatograms

Development of the *S,R*-(\pm)-ketoprofen samples was carried out at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for a distance of 15 cm using the binary mobile phase composed of ACN and water (H₂O) in the quantitative proportion of 5:1 (v/v), and it contained an extra addition of several drops of glacial acetic acid to fix the pH < 4.8 . It was carried out in the one-dimensional and the two-dimensional development mode, in both directions of the development using the same composition of mobile phase. The anticipated mechanism of retention with each of the two ketoprofen antipodes is given by Equation (1).

Sample application to the plates was with the use of an autosampler (the AS 30 model autosampler manufactured by Desaga, Heidelberg, Germany). The *S,R*-(\pm)-ketoprofen solutions were applied to the plate 1.5 cm above the lower edge of the plate in aliquots of 5 mL spot^{-1} (the one-dimensional development mode). Nine samples in the equal distance of 2 cm from one another were applied per one plate, and then the chromatogram was developed in the one-dimensional mode. After development, the plates were dried at ambient temperature for 3 h, and the surface of each plate was densitometrically scanned in 1-mm intervals in the direction of development. Each experiment was carried out on at least three plates. Thus the numerical results given in this paper originate from at least 27 individual development lanes, as

it was our aim to reliably assess the maximum deviation from verticality of the migration tracks with the separated pair of chiral antimers.

As mentioned earlier, development of the chromatograms was also carried out in the two-dimensional mode. Plates with a single 10- μ L spot of the *S,R*-(\pm)-ketoprofen solution at a corner were developed to a distance of 15 cm in the first direction. Then, the plates were first dried in an ambient atmosphere for 3 h and then developed to a distance of 15 cm in the second direction (perpendicular to the first one). After development the plates were again dried in an ambient atmosphere, and tracks 30 mm wide, in the first and the second direction of development, were scanned densitometrically in 1.5-mm intervals. This experiment was repeated three times.

Densitometric Assessment of the Thin Layer Chromatograms

Densitograms were acquired with a Desaga (Heidelberg, Germany) Model CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software. Concentration profiles of the development lanes for *S,R*-(\pm)-ketoprofen were recorded in ultraviolet (UV) light from the deuterium lamp (in the reflectance mode) at 252 nm (this was the approximate maximum of the UV absorption spectrum of ketoprofen, as densitometrically recorded in situ from the ketoprofen chromatograms). The dimensions of the rectangular light beam were 2.0 mm \times 0.1 mm. The maxima of the concentration profiles were used for calculation of R_F values.

High Performance Column Liquid Chromatography (HPLC)

The HPLC investigations were carried out with aid of the P580A LPG model liquid chromatograph, equipped with the Gina 50 model autosampler; UVD340V DAD model detector (GynkoteK/Dionex, Germering, Germany); and RP-18 column (LichroCART[®] cartridge with the LiChrospher[®] 100, 5 μ m; 250 mm, 4 mm i.d., cat.# 1.50983.0001, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Samples of *S,R*-(\pm)-ketoprofen in 70% ethanol were injected by the autosampler from the same stock solution in the 10-mL aliquots, in 30 min intervals for up to 5 h. The mobile phase flow rate was with all mobile phases equal to 0.6 mL min⁻¹. The investigated HPLC systems can be divided into the two categories:

- i. ACN as the solvent of the *S,R*-(\pm)-ketoprofen sample and ACN as the monocomponent mobile phase (see Figure 4); and
- ii. ACN as the solvent of the *S,R*-(\pm)-ketoprofen sample and the ACN + H₂O binary mobile phases. The applied volume percentages of

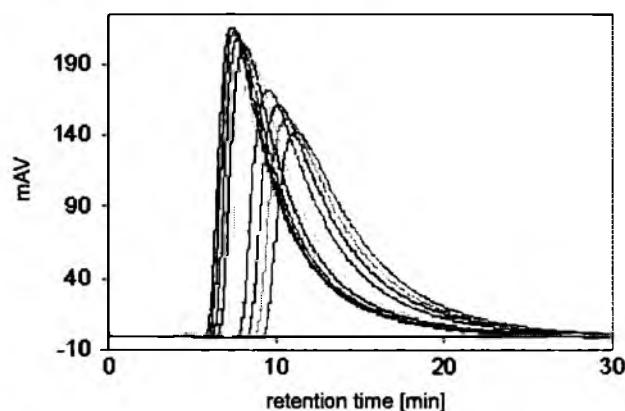


Figure 4. Tailing concentration profiles of *S,R*-(\pm)-ketoprofen dissolved in ACN and for 5 h developed with ACN by means of HPLC in 0.5 h time intervals. The longer the storage period of the *S,R*-(\pm)-ketoprofen solution in ACN, the longer is the retention time of the concentration profile maximum, and the greater is the tailing.

the added water were the following: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, and 10.0% (see Figures 5 and 6).

These experiments were meant to clearly demonstrate an enhanced viscosity of *S,R*-(\pm)-ketoprofen, when dissolved in an organic solvent (e.g., ACN), or in an organic-aqueous solvent with a limited amount of water in it.

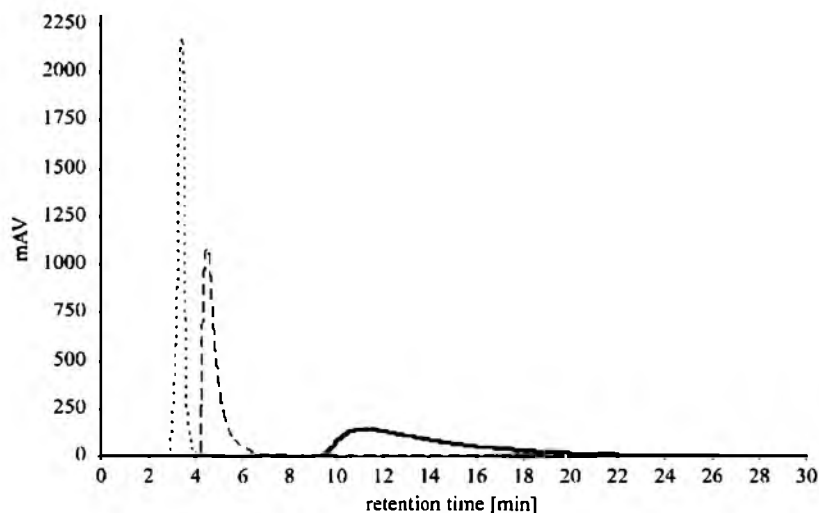


Figure 5. High performance liquid chromatograms of *S,R*-(\pm)-ketoprofen—a comparison. The mobile phases used: (i) — pure ACN; (ii) - - - - ACN + 1% H₂O; and (iii) ACN + 10% H₂O.

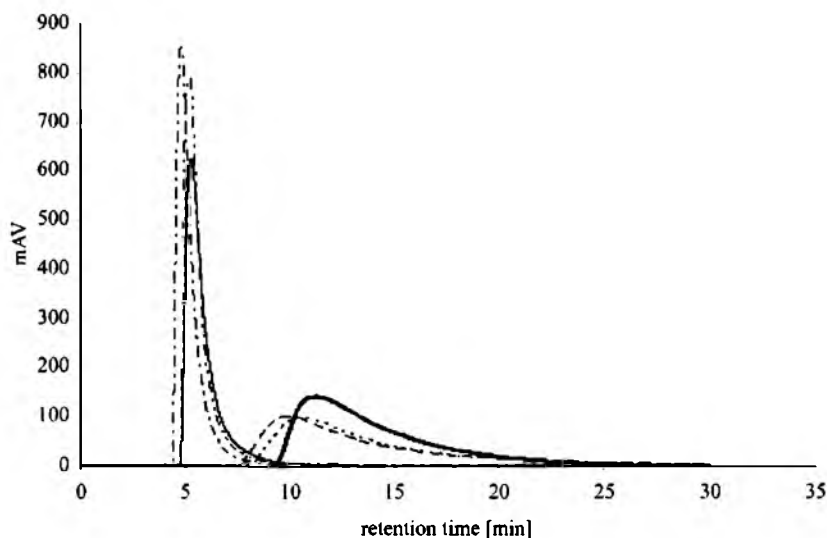


Figure 6. High performance liquid chromatograms of *S,R*-(\pm)-ketoprofen—a comparison. The mobile phases used: (i) — pure ACN; (ii) ---- ACN + 0.1% H₂O; (iii) ACN + 0.2% H₂O; (iv) - - - - ACN + 0.3% H₂O; (v) - · - · - ACN + 0.4% H₂O; (vi) — ACN + 0.5% H₂O.

RESULTS AND DISCUSSION

Polarimetry

It was not expected to obtain any spectacular polarimetric results in the case of the racemic mixture. Nevertheless, certain effects of the changing specific rotation were observed in the course of our experiment. The first time, immediately after dissolution of *S,R*-(\pm)-ketoprofen in 70% ethanol, the measured specific rotation was equal to $+4^\circ$, and within a short period of approximately 15 minutes it dropped down to 0° , and then remained unchanged through the rest of our experiment. The second time, the *S,R*-(\pm)-ketoprofen solution in 70% ethanol showed a stable specific rotation value equal to -2° . As demonstrated in our earlier paper,^[4] oscillatory transenantiomerization of 2-APAs is even better observable with the aid of TLC than polarimetry, and therefore we did not limit ourselves to polarimetric measurements only but utilized TLC as well.

Thin Layer Chromatography

From our thin layer chromatographic experiment, it is clear that the oscillatory transenantiomerization in the case of *S,R*-(\pm)-ketoprofen was relatively rapid.

As a matter of fact, its rate was comparable with that of automatic application of the samples of the investigated 2-APA solution to the chromatographic plate. As a result, positions of the nine *S,R*-(±)-ketoprofen bands on the same chromatogram give a repeated meandering pattern, as schematically shown in Figure 7. The meandering pattern of the chromatographic spots' positions corresponds well with these fragments of the two plots shown in Figure 1, which refer to the racemic mixture already obtained.

An even more persuasive proof of the oscillatory transenantiomerization occurring with ketoprofen is given in Figure 8. This plot clearly shows this striking phenomenon as a function of time, although the data points were not measured in even time intervals. However, each data point was calculated as an average of the nine R_F values originating from the same chromatographic plate, and for this reason the data presented are substantially more reliable than those originating from the individual measurements. The observed amplitude of the changing R_F values (i.e., ΔR_F) is in this case considerable and equal to ca. 0.20, which entirely excludes the effect of the measurement error (usually not higher than ± 0.02 of the dimensionless R_F units).

From our earlier investigations,^[7,8] it is obvious that 2-APAs, when developed either on the impregnated silica gel layer or on the plain one, show a considerable deviation of their migration tracks from verticality (with the chromatograms developed in the normal-Stahl-tank, in the ascending mode). This phenomenon is caused both by the chirality of the impregnating agent and of the silica gel,^[8] and it usually results in an enhanced separation of the two antimers in the horizontal direction (i.e., perpendicular to the analytes' migration route). In our previous studies,^[7,8]

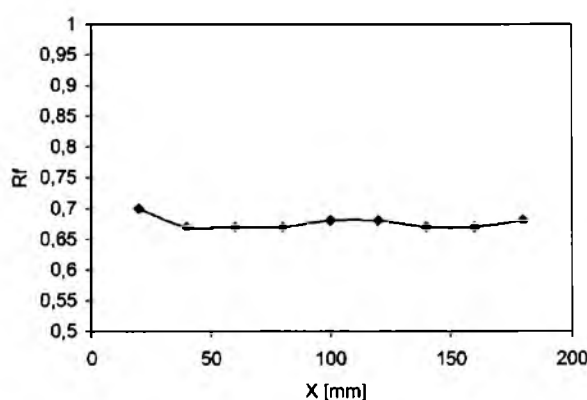


Figure 7. Oscillation of the R_F value as a function of the application position of the *S,R*-(±)-ketoprofen sample on the adsorbent layer [x : the distance of the sample application position from the left-hand edge of the chromatographic plate (mm)].

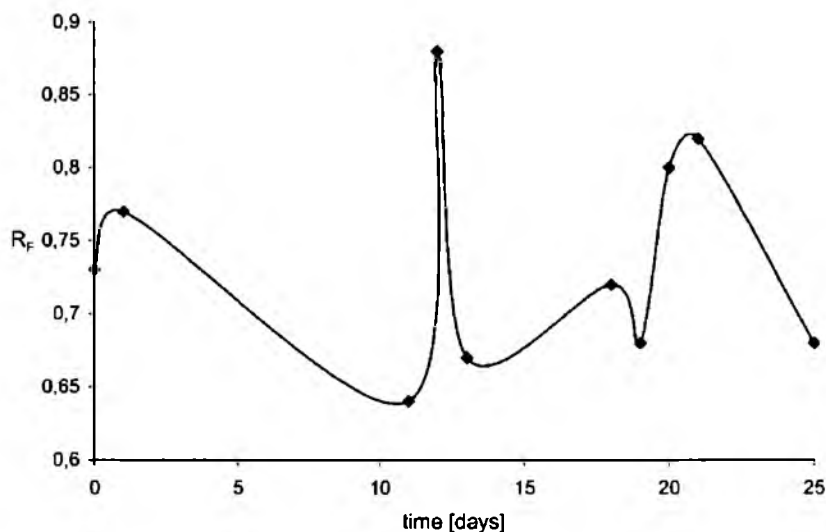


Figure 8. Oscillation of the R_F value as a function of the storage time (days) of the $S,R-(\pm)$ -ketoprofen sample as the 70% ethanol solution.

we observed cases when the migration route of one enantiomer deviated from verticality to the right and that of its antipode to the left.

Chiral separations are recognized as a difficult analytical task, and even more so when the antimers—like in the case of 2-APAs—are monocarboxylic acids, apt to form cyclic dimers kept together by hydrogen bonds. These hydrogen bonds apparently obstruct enantioseparation, and this negative effect is particularly annoying and acute when the separated sample is a racemic mixture (like the case with $S,R-(\pm)$ -ketoprofen), i.e., it contains equal proportions of the two antipodes. The separation task seems somewhat easier when there is a sufficient enantiomeric excess of one steric form (i.e., in the case of the scalemic mixtures). However, in the case of $S,R-(\pm)$ -ketoprofen, we managed to obtain chiral separations even when using the one-dimensional developing technique. The picture of a successful chromatographic separation (schematically shown in Figures 9 and 10) is rather striking.

Namely, we observed three instead of the two peaks originating from the same sample spotting, all three of them well separated and showing the same right-handed deviation from verticality of their respective migration tracks. The middle peak (in terms of the R_F value) proved predominant in quantitative terms, as demonstrated by means of two-dimensional chromatography and the subsequent scanning of the chromatogram. In order to check the chemical nature of these three peaks, the *in situ* UV absorption spectra were recorded for each individual peak and, to our surprise, these spectra were practically identical, both in terms of the shapes and positions of their respective maxima, and differed only in terms of the peak intensity (see Figure 11).

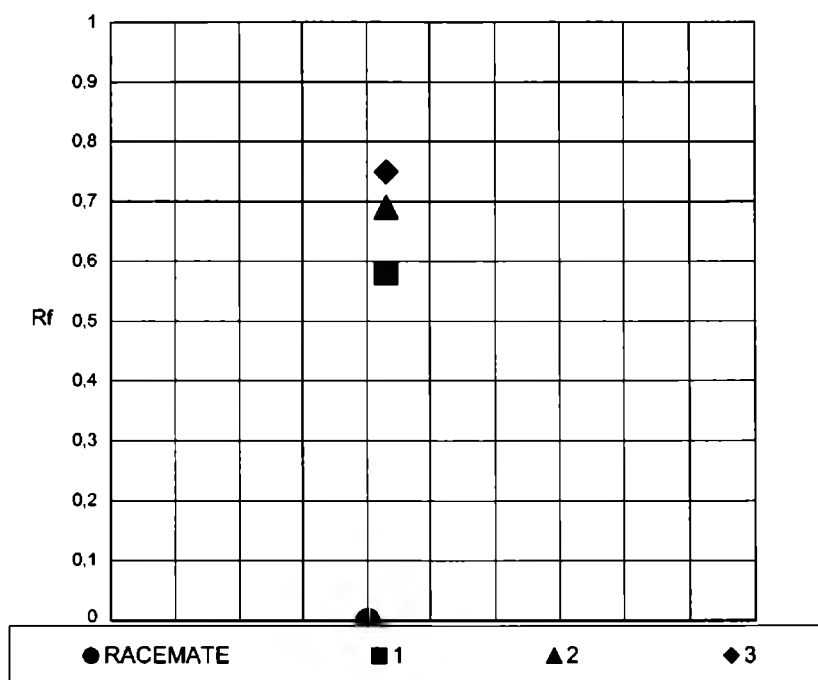


Figure 9. Schematic presentation of the right-handed deviation from verticality of the migration tracks with the three chromatographic peaks derived from the same *S,R*-(±)-ketoprofen sample. The respective R_F values were (in the increasing order): 0.58 ± 0.02 , 0.69 ± 0.02 , and 0.75 ± 0.02 . Stationary phase: Merck silica gel 60 F_{254} precoated plates, impregnated with L-arginine. Mobile phase: ACN - H_2O (5:1, v/v).

The R_F values for these three separated peaks were (in an increasing order): 0.58, 0.69, and 0.75. In the same order their deviation from verticality was equal to approximately 2, 3, and 4 mm. It is very difficult to judge the chemical nature of these three well separated peaks, and we cannot think at the moment of any measuring technique that might provide a definite answer to this question. However, two optional explanations seem probable, and perhaps one of them is correct.

Option 1. It seems possible that—in the case of the non-identical amounts of the *S*-(+) and the *R*-(-) species in a given mixture (due to the progress of the oscillatory transenantiomerization)—the following three fractions of the cyclic dimers could have been separated: *RR* (the lowest R_F value), *SR* (the medium R_F value, the predominant peak), and *SS* (the highest R_F value).

Option 2. It also seems likely that the following three fractions could have been separated: keto-enol tautomer derived from ketoprofen (the lowest R_F value), *SR* (the medium R_F value, the predominant peak), and *SS* (the

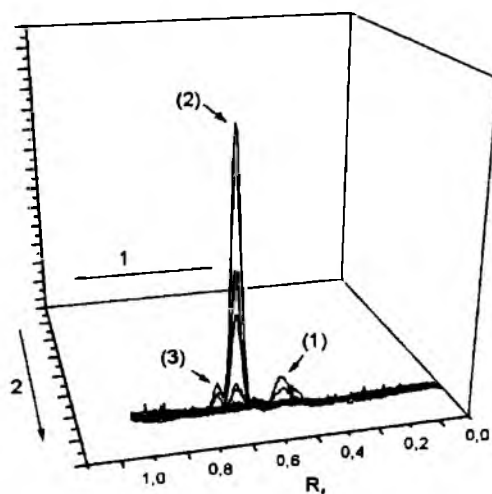


Figure 10. Three-dimensional presentation of the *S,R*-(±)-ketoprofen chromatogram with two development directions, 1 and 2, indicated. Densitometric scanning (at parallel 1.5-mm intervals) of the 30-mm wide track perpendicular to the second direction of the development was performed to better illustrate the separation performance and the skewed arrangement of the three separated species, indicated by arrows.

highest R_F value). Option no. 2 seems slightly less possible due to the fact that one should expect the identical UV absorption spectra of the two antimers of ketoprofen, yet a perceptibly shifted one in the case of the respective keto-enol tautomer. On the other hand, the *in situ* measured UV spectra of the separated species automatically mirror the fact that these compounds are adsorbed on the silica gel surface, thus their respective molecular orbitals are affected by the adsorption (as compared to the analogous UV spectra run in the solution).

HPLC

When we encounter any given oscillatory chemical process (these processes are not very popular, although not an absolute rarity either), our immediate interest focuses on the nature of the mechanism powerful enough to generate this exceptional phenomenon. As has been mentioned before, the most common source of oscillations is viscosity of the reaction medium, due to which the rate of diffusion of an intermediate reaction product (in our case the keto-enol tautomer) is lower than the rate of its cumulation. This kind of relation between the two rates (of diffusion and cumulation) can sometimes happen with certain multi-step reactions carried out in relatively viscous media.

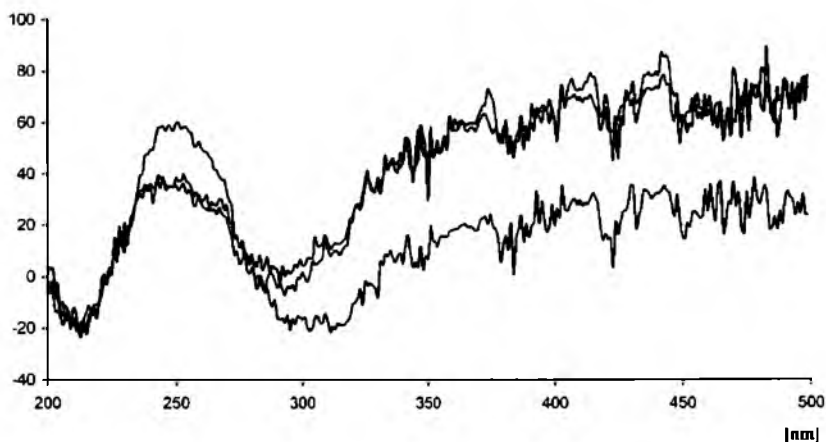


Figure 11. The UV spectra (recorded in situ on the chromatographic plate) of the three chromatographic peaks derived from the same *S,R*-(\pm)-ketoprofen sample, all showing the right-handed deviation from verticality of their respective migration tracks (see Figures 8 and 9).

In our earlier publication^[5] we pointed out to the gelating ability of 2-APAs, which is most obviously responsible for the oscillatory transenantio-merization of these chiral compounds. As a result, from the low-concentrated solutions of the 2-APAs we do not obtain the proper physical gels (i.e., highly elastic solids or quasi-solids), but solutions with their viscosity markedly higher than that of the pure solvents. In the same paper^[5] we proposed HPLC as a technique of choice to investigate the gelating ability of 2-APAs. If we dissolve a 2-APA in a low-molecular-weight solvent (e.g., 70% ethanol, ACN, THF, dichloromethane, etc.), inject this solution on the chromatographic column, and then use a low-molecular-weight solvent as the mobile phase, we are going to obtain a severely tailing concentration profile of an analyte as evidence of the enhanced viscosity of the injected solution. Looking at the chromatogram, one gets an impression that the “sticky” solution of the analyte considerably clogs the pores of stationary phase, perceptibly obstructing the eluent flow through the column and resulting in this enormous tailing.

In a Ph.D. thesis entirely devoted to physical gelation of low-molecular-weight organic solvents^[9] with low-molecular-weight organic gelators, a statement can be found that in the case of chiral gelators only optically pure species can play this particular role, and not racemic mixtures. From our earlier HPLC investigations, a similar observation could be derived^[10] (i.e., the concentration profile of *S,R*-(\pm)-2-phenylpropionic acid was not tailing, whereas the concentration profiles of *S*-(+)-ibuprofen and *S*-(+)-naproxen were heavily tailing). However, the polarimetric and the thin-layer chromatographic measurements of the *S,R*-(\pm)-2-phenylpropionic acid racemic

mixture clearly showed its continuous oscillations occurring within the relatively flat range of the two plots shown in Figure 1 and ascribed to the presence of the racemate in a dynamic equilibrium (and even more vigorous oscillations with the two optically pure species, i.e., with *S*-(+)-ibuprofen and *S*-(+)-naproxen). Two important conclusions could be drawn from our previous experiments, namely (i) that HPLC cannot be a fully reliable assessment technique, most probably showing the strongly pronounced gelating effects only and missing those that are less strong; and (ii) that the statement contained in the Ph.D. thesis^[9] as to the inability of the racemates to act as gelators may not always prove true.

The two conclusions above proved correct in view of the results obtained in our present study. Namely, from the strongly tailing shape of the concentration profiles of *S,R*-(±)-ketoprofen (see Figure 4) it is clear that this racemate has a pronounced gelating property. Additionally, the longer the storage period of the *S,R*-(±)-ketoprofen solution in ACN, the longer was the retention time of the profile's maximum, and the more it tailed. In the other words, the longer the storage period with the investigated solution, the more pronounced became the effect of its gelation.

From the *S,R*-(±)-ketoprofen peak profiles shown in Figures 5 and 6, it is evident that the stepwise addition of the increased amounts of water to the *S,R*-(±)-ketoprofen—ACN system results in gradual destruction of the gelated mixture, as confirmed by the increasingly symmetric concentration profiles of the investigated ketoprofen. Once again, the results of the presented HPLC experiment confirmed our earlier finding as to the gelating effect of the 2-APAs as an indispensable precondition of their oscillatory transesterification.

CONCLUSIONS

The results presented in this paper fully confirm our earlier findings with respect to the oscillatory transesterification of the chiral 2-APAs. It was demonstrated that—similar to *S*-(+)-ibuprofen, *S*-(+)-naproxen, and *S,R*-(±)-2-phenylpropionic acid—*S,R*-(±)-ketoprofen also undergoes the oscillatory transesterification, in an oscillatory manner repeatedly abandoning its racemic (i.e., 1:1) molar composition. Simultaneously, the specificity of the behavior of each individual 2-APA, inherent of its unique molecular structure, was confirmed through our current results.

Among the most important findings reported in this paper was that the racemic mixture (in this case *S,R*-(±)-ketoprofen) can prove to be a low-molecular-weight gelating agent when dissolved in low-molecular-weight solvents. Earlier, it has been quite firmly believed that the racemates can by no means act as gelators, the property demonstrated by the optically pure enantiomers only.

10. Sajewicz, M.; Kowalska, T. On the problems with liquid chromatographic quantification of the chiral 2-arylpropionic acids (2-APAs) by means of the UV-absorption-based detection. *Acta Chromatogr.* **2006**, *17*, 292–301.

Received October 10, 2006

Accepted November 20, 2006

Manuscript 6104I

**STUDY OF THE OSCILLATORY IN-VITRO
TRANSENANTIOMERIZATION
OF THE ANTIMERS OF FLURBIPROFEN
AND THEIR ENANTIOSEPARATION
BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC)**

*M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, Ł. Wojtal, G. Grygierczyk,
and T. Kowalska*

Institute of Chemistry, Silesian University, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

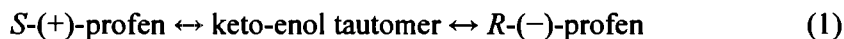
SUMMARY

In our earlier studies on the spontaneous in-vitro oscillatory trans-enantiomerization of profens we investigated optically pure *S*-(+)-ibuprofen and *S*-(+)-naproxen and the racemic mixtures *S,R*-(±)-2-phenylpropionic acid and *S,R*-(±)-ketoprofen, which remained in a state of dynamic equilibrium between the two antimers yet also had the ability to transenantiomerize. In this study we have demonstrated, for the first time, the spontaneous oscillatory in-vitro transenantiomerization of *S*-(+)-flurbiprofen (an important non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID) and *R*-(-)-flurbiprofen, as monitored by polarimetry.

It is also noteworthy that – as far as we are aware – this is the first report of separation of the enantiomers of flurbiprofen by TLC. This separation was achieved by two-dimensional development using a simple chromatographic system comprising a commercial silica gel layer impregnated with L-arginine as stationary phase and ethanol containing a few drops of glacial acetic acid as mobile phase. Unfortunately, this chromatographic system resulted in catalysis of structural conversion of the optically pure flurbiprofen enantiomer, either *S*-(+), or *R*-(-), to the scalemic or racemic mixture of the two antimers. This is an interesting contribution to general knowledge about the reactivity of this particular profen, although the spontaneous and rapid conversion observed prevents use of this TLC system for identification and quantification of individual flurbiprofen enantiomers.

INTRODUCTION

We have previously [1–4] presented results from studies of the spontaneous oscillatory in-vitro transenantiomerization of the profens *S*-(+)-ibuprofen, *S*-(+)-naproxen, *S,R*-(±)-2-phenylpropionic acid, and *S,R*-(±)-ketoprofen when dissolved in low-molecular-weight solvents (e.g. 70% ethanol, dichloromethane, and physiological saline solution). The most probable conversion mechanism, with the keto–enol tautomer as intermediate, is shown in eq. (1):



From our earlier considerations it was apparent that oscillatory transenantiomerization of the optically pure enantiomers of profen can be illustrated by the scheme given in Fig. 1, which shows the oscillatory decrease of the concentration with the starting *S*-(+) enantiomer and the simultaneous oscillatory increase in the concentration of its *R*-(–) antimer, the transenantiomerization product.

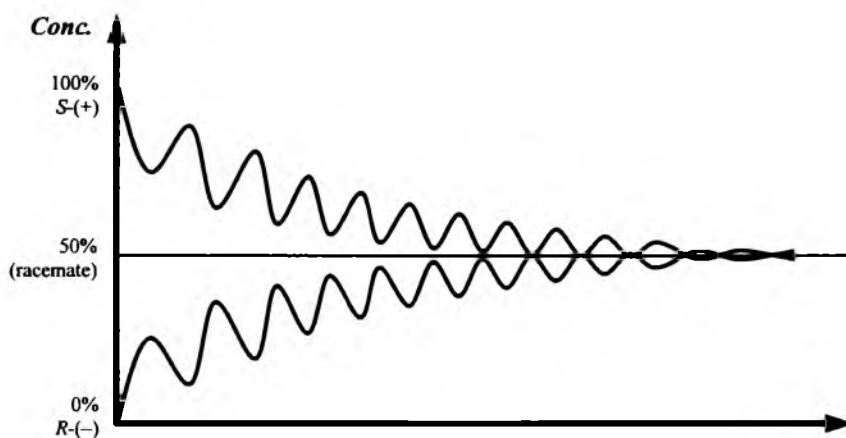


Fig. 1

Schematic representation of the oscillatory transenantiomerization of an *S*-(+) profen to its *R*-(–) antimer. The oscillatory plots mirror the oscillatory decrease of the concentration of the *S*-(+) species and the corresponding oscillatory increase of the concentration of the *R*-(–) species

We previously [5] offered an explanation of the molecular mechanism responsible for the oscillatory processes. There are two necessary preconditions for such oscillation. One is that the oscillatory processes con-

sist of more than one elementary step (at least one of which is, preferably, of a higher reaction order), so they must be chain reactions. The other necessary precondition is that the solutions in which oscillatory processes occur are anisotropic. For profens and their transesterification both necessary preconditions seem to be fulfilled. From eq. (1) it is clearly apparent that transesterification of the profens is not the one-step process. It was also shown [5] that the molecules of profens have the ability to self-organize within a solution (either by gelation or by formation of liquid crystal-like structures), which results in anisotropy of the solution. Thus the oscillatory mechanism of transesterification in the multi-step process in the anisotropic solution ought to be kinetic-diffusive in nature.

The separate objectives of this study were to investigate the ability of the two flurbiprofen antimers to undergo oscillatory structural conversion and to elaborate working conditions for separation of the enantiomers of flurbiprofen by TLC.

EXPERIMENTAL

S-(+)-Flurbiprofen and *R*-(-)-Flurbiprofen

The structure of the flurbiprofen molecule is shown schematically in Fig. 2. It is noteworthy that – unlike ibuprofen, naproxen, ketoprofen,

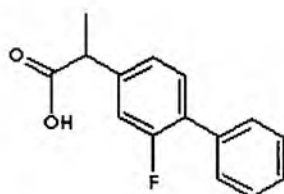


Fig. 2

Schematic representation of the molecular structure of flurbiprofen

or 2-phenylpropionic acid – flurbiprofen contains one strongly electronegative fluorine atom in its structure. In our study we used *S*-(+)-flurbiprofen and *R*-(-)-flurbiprofen manufactured by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA; cat. # 482641-500MG and 545740-1G, respectively). In thin-layer chromatography we used solutions of each enantiomer in 70% ethanol at concentrations of 0.1, 0.5, and 1.0 mg mL⁻¹ (i.e. ca 0.41×10^{-3} , 2.05×10^{-3} , and 4.10×10^{-3} mol L⁻¹). We also used a racemic mixture of flurbiprofen dis-

solved in 70% ethanol, containing 0.2 mg mL^{-1} (i.e. $\text{ca } 0.82 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) of each enantiomer. In polarimetry we used solutions of each enantiomer in 70% ethanol at a concentration 50 mg mL^{-1} (i.e. $\text{ca } 2.05 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$).

Polarimetric Measurement of Specific Rotation, $[\alpha]_D$

Measurement of the specific rotation ($[\alpha]_D$) of solutions of *S*-(+) and *R*-(-)-flurbiprofen in 70% ethanol were performed at ambient temperature for eight days (the *S*-(+) species) or nine days (the *R*-(-) species), seven hours per day (at 10-min intervals), by use of a Polamat A polarimeter manufactured by Carl Zeiss (Jena, Germany). The optical path length of the measurement cell was 10 cm, and its volume was ca 1 mL. Specific rotation, $[\alpha]_D$, was calculated by use of the standard equation:

$$[\alpha]_D = 100\alpha/cd \quad (2)$$

where α is the measured rotation (in angle degrees), D is the wavelength used, $\lambda = 589 \text{ nm}$, which corresponds to the sodium D line, c is the concentration of a given compound in g (100 mL)^{-1} solution, and d is the measured sample thickness in dm.

From the literature [6] it is known that the specific rotation of *S*-(+) and *R*-(-)-flurbiprofen is ca $+43^\circ$ and -43° , respectively.

Commercial TLC Silica Gel Layers and Their Pretreatment

TLC was performed on $20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ commercial glass plates pre-coated with 0.25 mm layers of silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany; cat. # 1.05715). Before use, the plates were carefully washed by pre-development with methanol–water, 9:1 (v/v), then dried at ambient temperature for 3 h.

The washed and dried plates were then impregnated by conventional dipping for 2 s in a solution ($3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) of L-arginine in methanol. The concentration of the impregnating solution was calculated as that depositing 0.5 g L-arginine per 50 g dry silica gel. The impregnated adsorbent layers were ready for chromatography.

Mobile Phase and Development of Thin-Layer Chromatograms

Solutions of *S*-(+) or *R*-(-)-flurbiprofen (3- μL) or their racemic mixture (15 μL), in 70% ethanol, were applied to the lower left-hand corner of the plates, 1.5 cm from the edges, by use of a Desaga (Heidelberg, Germany) AS 30 autosampler. Two-dimensional development to a distance of 15 cm, in directions perpendicular to each other, was performed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

In both directions ethanol with addition of a few drops of glacial acetic acid was used as mobile phase. Between developments plates were dried at ambient temperature for 3 h. Each chromatographic experiment was repeated three times.

Scanning Densitometry and Flatbed Videodensitometry

After the second development the plates were again dried at ambient temperature. Tracks 30 mm wide, in the second direction of development, were then scanned densitometrically, at 1-mm intervals, with a Desaga CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software. Concentration profiles of the development lanes of *S*-(+) and *R*-(-)-flurbiprofen were recorded in ultraviolet (UV) light from the deuterium lamp (in reflectance mode) at 245 nm. The dimensions of the rectangular light beam were 2.0 mm × 0.1 mm.

The chromatograms were also scanned at 254 nm and the Chrom-image flatbed scanner (AR2i, Le Plessis Robinson, France) was used to record pictures taken in the UV light.

RESULTS AND DISCUSSION

Polarimetry

Polarimetric measurement of the specific rotation ($[\alpha]_D$) of solutions of *S*-(+) and *R*-(-)-flurbiprofen in 70% ethanol was performed for eight and nine days, respectively, seven hours per day (except at weekends, when no measurements were made for two consecutive days). The results obtained are shown in Figs 3 and 4, respectively.

It is apparent from Figs 3 and 4 that the general trend for both *S*-(+) and *R*-(-)-flurbiprofen was of the specific rotation drifting toward zero, which means that with the *S*-(+) species it was decreasing and with the *R*-(-) species it was increasing. It can be concluded that each flurbiprofen antimer tends, on dissolution in 70% ethanol, to racemize and that the oscillatory nature of this tendency is well depicted by the plots shown in Fig. 1.

To confirm directly that prolonged storage of flurbiprofen solutions results in structural conversion, a thin-layer chromatographic procedure for separation and quantification of the two enantiomers of flurbiprofen had to be established. The results obtained are presented in the next section.

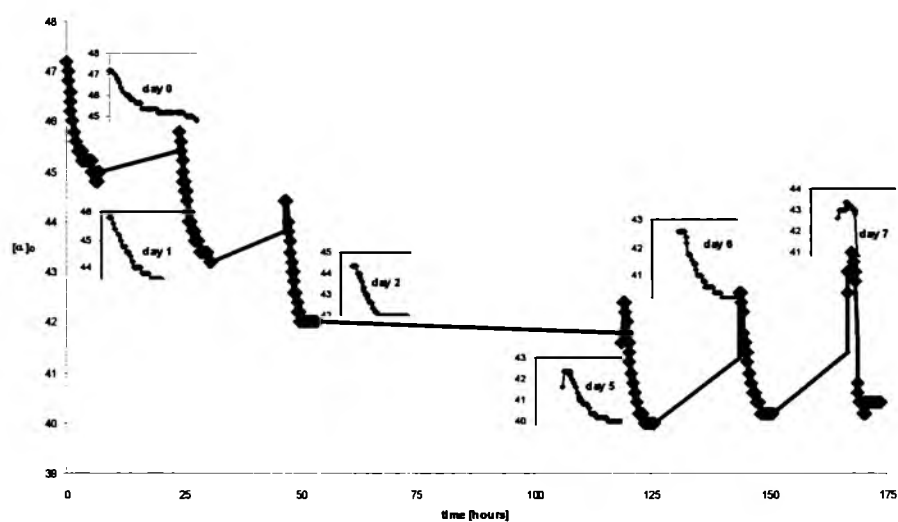


Fig. 3

The oscillatory change of the specific rotation, $[\alpha]_D$, of S-(+)-flurbiprofen as a function of time

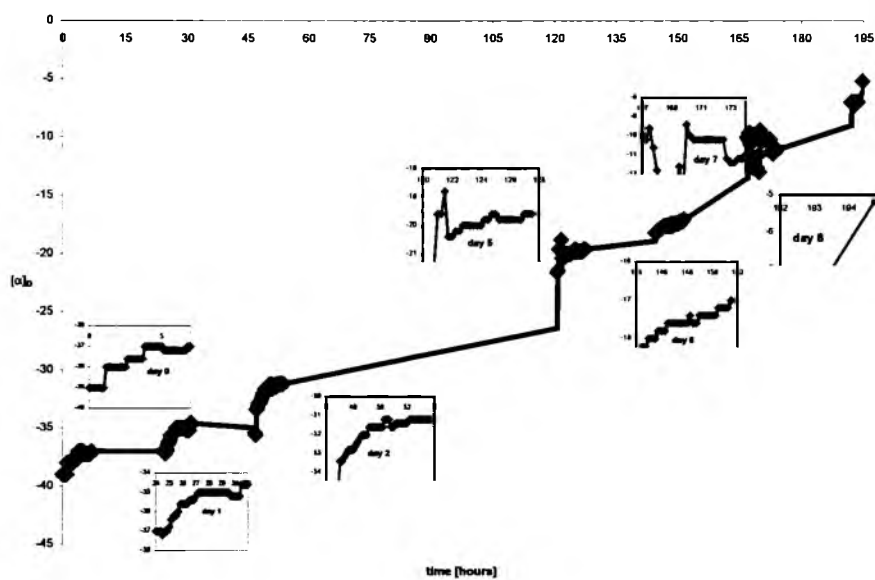
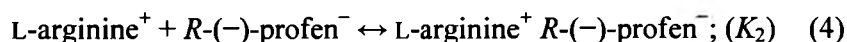
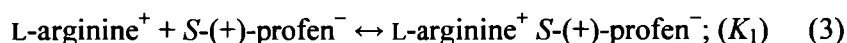


Fig. 4

The oscillatory change of the specific rotation, $[\alpha]_D$, of R-(-)-flurbiprofen as a function of time

Thin-Layer Chromatographic Separation of the Enantiomers of Flurbiprofen

First, it must be mentioned that as far as we are aware there is no literature report of successful separation of the enantiomers of flurbiprofen by TLC. It thus seemed an urgent task to establish satisfactory conditions for separation of these enantiomers. We decided to take advantage of the non-commercial chiral stationary phase proposed by Bhushan and Parshad [7] for separation of the enantiomers of ibuprofen – commercial silica gel impregnated with L-arginine. As mobile phase we chose pure ethanol containing a few drops of glacial acetic acid, to protonate the amino group of L-arginine. Thus separation of the enantiomers was achieved by the mechanism of ion-pair formation, as expressed by the equations:



where $K_1 \neq K_2$.

To achieve complete separation of the two flurbiprofen antimers, two-dimensional chromatography was used, as described in the Experimental section. Separation of the enantiomers of the test racemate comprising *S*-(+) and *R*-(-)-flurbiprofen standards is shown in Figs 5 and 6.

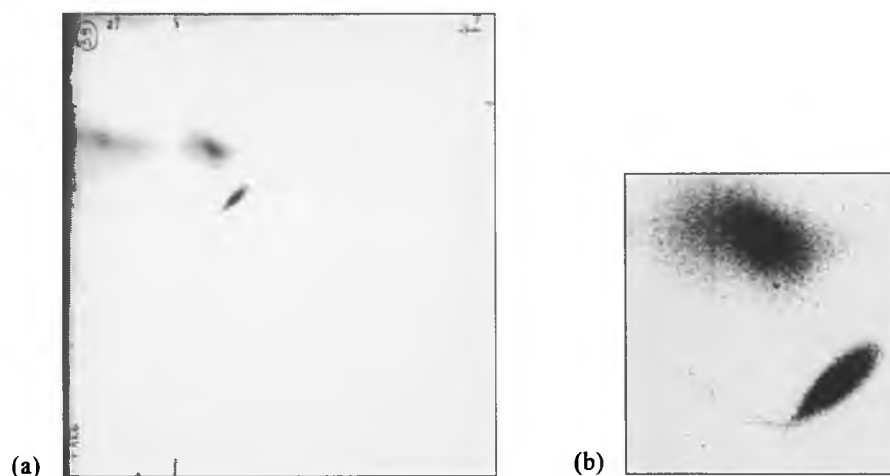


Fig. 5

Video densitograms of (a) the whole plate developed in the two-dimensional mode, and (b) the skewed chromatographic spots of the two separated flurbiprofen antimers. The chromatogram shows separation of a racemic mixture of *S*-(+) and *R*-(-)-flurbiprofen

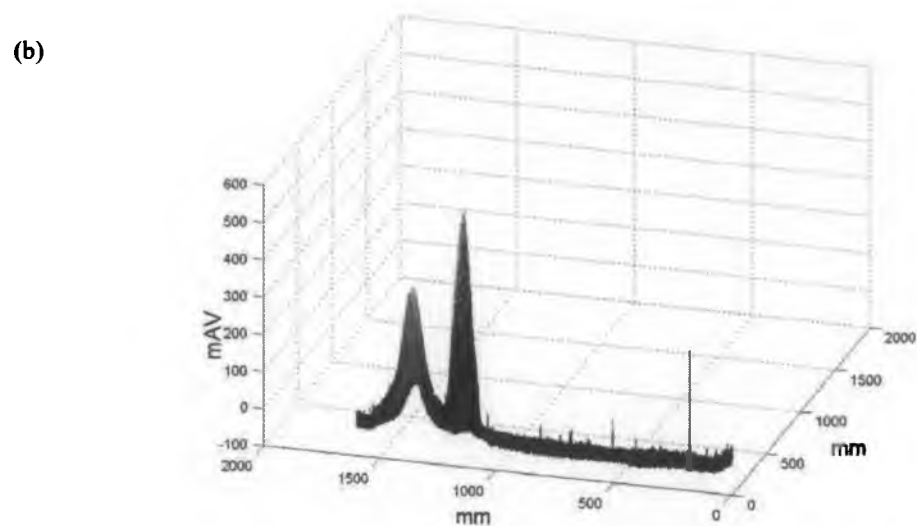
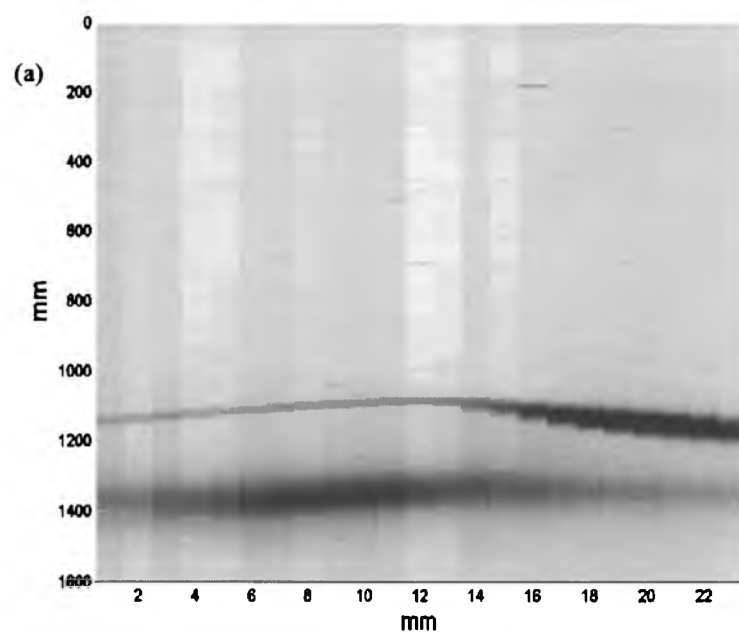


Fig. 6

Two-dimensional (a) and three-dimensional (b) representation of the chromatographic spots of the two separated flurbiprofen antimers from Fig. 5, reconstructed from scanning densitograms of a track 30 mm wide taken at 1-mm intervals

This separation was confirmed in two different and independent ways.

- i. The two separated bands of the *S*-(+) and the *R*-(-) species were identified directly on the chromatogram, by acquiring their respective UV spectra in situ. Identical UV spectra were obtained from both bands.
- ii. We also scraped the separated bands from the chromatogram, extracted the compounds of interest from the silica gel, with ethanol, and analyzed each extract separately by non-chiral HPLC with diode-array detection (DAD). From the two extracts we obtained chromatographic peaks with the same retention time and, again, the same UV spectrum of flurbiprofen.

After having established a TLC method for separation of the enantiomers of flurbiprofen, we chromatographed freshly prepared solutions of pure *S*-(+) and *R*-(-)-flurbiprofen in 70% ethanol. In that way we tried to ascribe the upper and the lower chromatographic band to the respective antimers. We did not succeed, however, because – to our utter surprise –

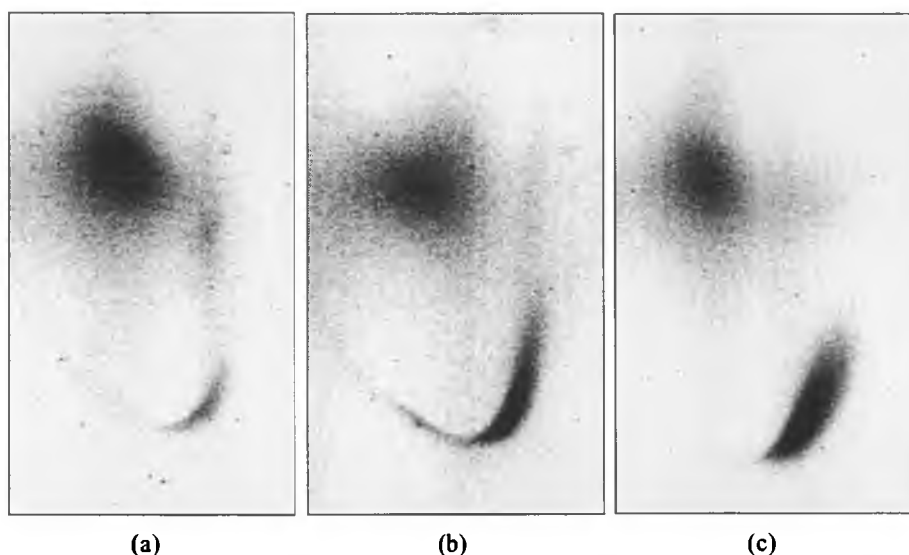


Fig. 7

Video densitograms of the spots obtained from the separated flurbiprofen antimers. The chromatograms show separation of the racemic mixtures obtained by chromatography of samples of pure *R*-(-)-flurbiprofen. The amount spotted was 3 μL and the concentrations of the solutions spotted were (a) 0.1 mg mL^{-1} , (b) 0.5 mg mL^{-1} , and (c) 1.0 mg mL^{-1}

the chromatograms obtained from the pure flurbiprofen antimers looked exactly the same and identical with that obtained from the racemic mixture. Pictures of the spots obtained for the three different concentrations of *R*-(-)-flurbiprofen dissolved in 70% ethanol and developed in the two-dimensional mode are shown in Fig. 7. In purely qualitative terms, Figs 7a–7c look identical with Fig. 5b, obtained for the racemic mixture of flurbiprofen. For the sake of brevity, we do not present the two-dimensional chromatograms obtained from different concentrations of the freshly prepared sample of optically pure *S*-(+)-flurbiprofen; for this isomer also we obtained chromatograms identical with that from the racemic mixture.

An even more persuasive picture of this most unexpected chromatographic result is shown in Fig. 8, which shows the three-dimensional densitograms obtained from the separated chromatographic spots shown in Figs 7a–7c. From this figure it is clearly apparent that with increasing amounts of *R*-(-)-flurbiprofen in the sample spotted, the chromatographic profiles of the separated bands also increase.

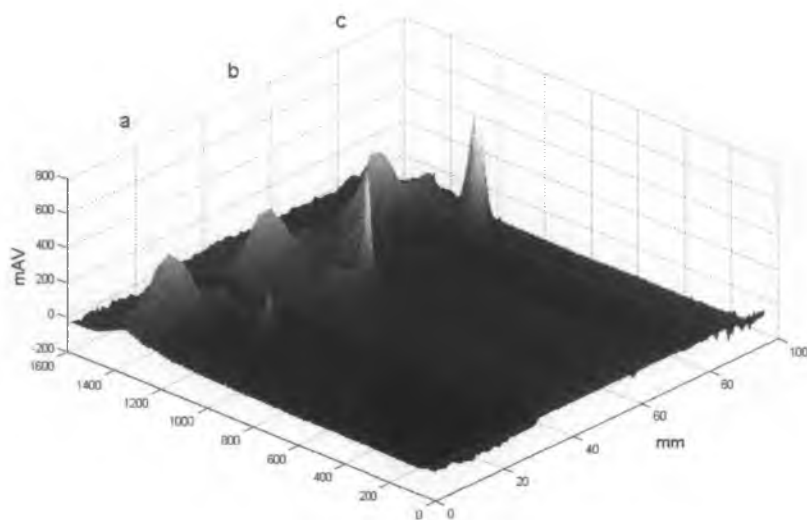


Fig. 8

Three-dimensional representation of the spots of the two separated flurbiprofen antimers from Figs 7a–7c, reconstructed from the scanning densitograms of tracks 30 mm wide taken at 1-mm intervals. The chromatograms show separation of the racemic mixtures obtained by chromatography of samples of pure *R*-(-)-flurbiprofen. The amount spotted was 3 μL and the concentrations of the solutions spotted were (a) 0.1 mg mL^{-1} , (b) 0.5 mg mL^{-1} , and (c) 1.0 mg mL^{-1} .

This result leads to the conclusion that during chromatography *R*-(-) and *S*-(+)-flurbiprofen undergo racemization induced by the thin-layer chromatographic system. This is an interesting contribution to our general knowledge about the ease with which this particular profen spontaneously racemizes, if dissolved in a suitable medium. At the same time the rapid conversion observed prevents use of this TLC system for identification and quantification of the individual flurbiprofen enantiomers in any sample.

CONCLUSIONS

In this study the oscillatory transenantiomerization of *S*-(+) and *R*-(-)-flurbiprofen over one week was clearly demonstrated for the first time. We have previously reported the oscillatory transenantiomerization of single optically pure enantiomers of *S*-(+)-ibuprofen and *S*-(+)-naproxen only. As measurement tool we used polarimetry, and the change of the specific rotation, $[\alpha]_D$, was used as indicator of the oscillatory structural inversion of the two enantiomers of flurbiprofen.

In this paper the first separation of the two flurbiprofen enantiomers by two-dimensional TLC is also reported. The separation was achieved by TLC on silica gel impregnated with L-arginine, with ethanol containing a few drops of glacial acetic acid as mobile phase. Simultaneously, however, it was proved experimentally that during chromatography *R*-(-) and *S*-(+)-flurbiprofen undergo vigorous racemization which, despite good separation performance, prevents use of this TLC method for identification and quantification of the individual flurbiprofen enantiomers.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank Merck KGaA (Darmstadt, Germany) for supplying the TLC plates used in our experiments. The authors also wish to thank the AR2i Company (Le Plessis Robinson, France) for supplying the Chromimage video densitometer and the Galaxie-TLC software used in the study.

REFERENCES

- [1] M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **15**, 131 (2005)

- [2] M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, and T. Kowalska, *J. Chromatogr. Sci.*, **43**, 542 (2005)
- [3] M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **29**, 2059 (2006)
- [4] M. Sajewicz, M. Gontarska, M. Wróbel, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **30**, 2193 (2007)
- [5] M. Sajewicz, R. Piętka, P. Kuś, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **16**, 181 (2006)
- [6] Aldrich Advancing Science Catalog 2005–2006
- [7] R. Bhushan and V. Parshad, *J. Chromatogr. A*, **721**, 369 (1996)

Thin-Layer Chromatographic and Polarimetric Investigation of the Oscillatory In-Vitro Chiral Inversion of *S*(+)-Ketoprofen

Mieczysław Sajewicz, Monika Gontarska, Dorota Kronenbach, and Teresa Kowalska*

Key Words

S(+)-Ketoprofen
TLC
Polarimetry
Oscillatory chiral inversion

Summary

Our earlier thin-layer chromatographic and polarimetric investigations enabled discovery of the spontaneous in-vitro oscillatory chiral inversion of the profen drugs *S*(+)-ibuprofen, *S*(+)-naproxen, and *S*(+) and *R*(-)-flurbiprofen, etc., and then of the α -amino acids L-phenylalanine, L-alanine, and L-tyrosine. In those investigations, thin-layer chromatography convincingly demonstrated its potential as a flexible and handy tool in the service of physical organic chemistry in general and investigation of organic reaction mechanisms in particular. Later – largely on the basis of thin-layer chromatographic evidence – we proposed a reaction–diffusion model that may provide the core of a mechanistic understanding of the spontaneous oscillatory in-vitro chiral inversion of profens and α -amino acids. In this study, we present thin-layer chromatographic and polarimetric evidence of the analogous process of the oscillatory chiral in-vitro inversion of *S*(+)-ketoprofen, which is meant to expand an already existing database, mostly originating from our laboratory and documenting the universal nature of this process with α -substituted chiral propionic acid derivatives (in the first instance, profen drugs and α -amino acids).

1 Introduction

The spontaneous oscillatory in-vitro chiral inversion of selected profens (2-arylpropionic acids from the group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) was first reported in our papers [1–5]. These profens were *S*(+)-ibuprofen, *S*(+)-naproxen, *S,R*(\pm)-2-phenylpropionic acid, *S,R*(\pm)-ketoprofen, and *S*(+) and *R*(-)-flurbiprofen. We then ascribed to this process a simplified reaction mechanism, originating from the literature [6] and given below:



Later we managed to demonstrate that the spontaneous oscillatory in-vitro chiral inversion is also characteristic of selected α -amino acids (L-phenylalanine, L-alanine, and L-tyrosine) [7–9],

whose molecular structure can – formally at least – be derived from propionic acid. For the α -amino acids, a simplified reaction mechanism is analogous to that given by eq. (1):



In Ref. 8, a kinetic–diffusive model of the oscillator was proposed, providing the core of a mechanistic understanding of the oscillatory chiral inversion both of the profens and the α -amino acids. This oscillator applicable to profens and α -amino acids was derived from the earlier devised Templator [10, 11] and adapted to the simultaneous oscillatory chiral inversion of the two chiral antimers in the form of the two linked Templators.

The oscillatory in-vivo chiral inversion of profens has been frequently reported for the past thirty years and eventually this abundant evidence was summarized in 2004, in the review article bearing a symptomatic title, “Chiral Inversion of Drugs: A Coincidence or Principle?” [12]. Similarly, the spontaneous chiral inversion of L-amino acids to their respective D-antimers in natural (e.g., geological) processes, has been reported in the literature for over thirty years and this knowledge has been used for dating of the fossilized organic matter [13, 14].

In this study, we decided to collect thin-layer chromatographic and polarimetric evidence of the spontaneous oscillatory in-vitro chiral inversion of *S*(+)-ketoprofen, with the intention of expanding an already existing database (mostly originating from our laboratory), which documents the universality of this process for α -substituted chiral propionic acid derivatives (in the first instance, profen drugs and α -amino acids). It seems highly probably that the in-vitro chiral inversion of profens and α -amino acids is a principle rather than coincidence in a similar way, as it has been observed in analogous processes occurring in vivo.

2 Experimental

2.1 *S*(+)-Ketoprofen

The structural formula of *S*(+)-ketoprofen is given in Figure 1. In this study, we used *S*(+)-ketoprofen purchased from

M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska, Institute of Chemistry, Silesian University, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland.
E-mail: kowalska@us.edu.pl

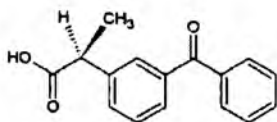


Figure 1

The chemical structure of *S*(+)-ketoprofen.

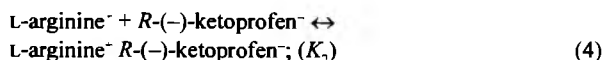
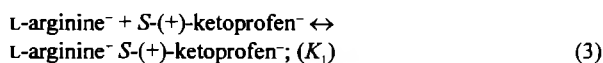
Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA; #471909-1G) [15]. For thin-layer chromatography (TLC), we used three different solutions of *S*(+)-ketoprofen in ethanol–water 7:3 (v/v), ethanol–glacial acetic acid 7:3 (v/v), and ethanol–basic buffer, pH 9, 7:3 (v/v), all of equal concentration of 0.1 mg L⁻¹ (3×10^{-4} mol L⁻¹). Samples of *S*(+)-ketoprofen were then stored at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for either ten days (for ethanol–water as mixed solvent) or eight days (for the other two solvent mixtures).

For polarimetric experiments, we used three different solutions of *S*(+)-ketoprofen in the same mixed solvents, all of equal concentration of 10 mg L⁻¹ (3×10^{-2} mol L⁻¹). The polarimetric experiments were run at 9 ± 2 and $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2 Thin-Layer Chromatography

The thin-layer chromatographic procedure has been described elsewhere [16]. Chromatography was performed on commercial glass plates (20 cm \times 20 cm) coated with 0.25-mm layers of silica gel (Merck, Darmstadt, Germany; #1.05715). Before use, the plates were predeveloped with methanol–water 9:1 (v/v) and dried at ambient temperature for 3 h. The plates were then impregnated with L-arginine by dipping for 2 s in a solution of L-arginine in methanol of concentration 3×10^{-2} mol L⁻¹, to deposit 0.5 g amino acid per 50 g dry silica gel.

If in-vitro chiral inversion of *S*(+)-ketoprofen occurred, this effect could be monitored by TLC and separation of the two ketoprofen antimers would be possible. The mechanism of the expected enantiomer separation would be classical ion-pair formation resulting in the two diastereoisomeric salts, as illustrated by the relationships:



where $K_1 \neq K_2$.

Development of the chromatograms was performed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ in the one-dimensional and two-dimensional modes, in both cases using acetonitrile–water 5:1 (v/v) acidified with several drops of glacial acetic acid (to maintain the pH <4.8) as mobile phase.

S(+)-Ketoprofen samples were applied to the plates by use of an autosampler (the Desaga (Heidelberg, Germany) model AS 30). For one-dimensional development, the *S*(+)-ketoprofen solution was spotted 1.5 cm above the lower edge of the plate in volumes of 5 μL per spot⁻¹. Nine samples at equal distances of 2 cm from one another were applied per plate, and the chromatogram was developed to a distance of 15 cm in the ascending mode. After development, the plate was dried at ambient temperature for 3 h and each development track on the chromatogram was densitometrically scanned in the direction of development.

For two-dimensional development, only one 10- μL sample of the *S*(+)-ketoprofen solution was spotted at the corner of the plate (at a distance of 1.5 cm from the lower and left hand edges of the plate) and the chromatogram was then developed to a distance of 15 cm. The plate was dried in ambient air for 3 h and again developed to a distance of 15 cm in the second direction perpendicular to the first. The plate was then dried and densitometrically scanned in 1-mm intervals at a width of 3 cm in the second direction of development.

Each chromatographic experiment was repeated three times. Densitograms were acquired with a Desaga model CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software. Concentration profiles of the development lanes for *S*(+)-ketoprofen were recorded in UV light from the deuterium lamp (in reflectance mode) at 252 nm. The dimensions of the rectangular light beam were 0.2 mm \times 1.0 mm. The maxima of the concentration profiles were used for calculation of the retardation coefficient (R_F) values.

2.3 Polarimetric Measurements of the Specific Rotation $[\alpha]_D$

Measurements of the specific rotation $[\alpha]_D$ were carried out in two independent experiments. In experiment 1, we used *S*(+)-ketoprofen solution in ethanol–water 7:3 (v/v) and the measurements were carried out for 10 days, several hours per day, at 15-min intervals.

In experiment 2, we used *S*(+)-ketoprofen solutions in ethanol–water 7:3 (v/v), ethanol–glacial acetic acid 7:3 (v/v), and ethanol–basic buffer, pH 9, 7:3 (v/v). In this case, the measurements were performed for 360 min at 15-min intervals at two different temperatures (9 ± 2 and $22 \pm 2^\circ\text{C}$), with stirring by use of a model RK 255H Sonorex Super (Bandelin, Berlin, Germany) ultrasonic bath, or without stirring.

Specific rotation was measured with a Carl Zeiss (Jena, Germany) Polamat A polarimeter. The optical path length of the measurement cell was exactly 10 cm (1 dm), and its volume was ca 1 mL. Specific rotation $[\alpha]_D$ was calculated by use of the standard equation:

$$[\alpha]_D \times 100 \alpha / cd \quad (3)$$

where α is the measured rotation (in angle degrees), D is the wavelength used, 589 nm, which corresponds to the sodium D line, c is the concentration of the compound in g per 100 mL solution, and d is the measured sample thickness in dm.

From the literature [15] it is known that specific rotation ($[\alpha]_D$) of *S*(+)-ketoprofen at 22°C is $+49^\circ$.

3 Results and Discussion

3.1 Thin-Layer Chromatography

The objective of the thin-layer chromatographic experiments was to collect empirical evidence on the oscillatory chiral transesterification of *S*(+)-ketoprofen to its *R*(-) antimer when dissolved in the three binary mixtures ethanol–water, ethanol–glacial acetic acid, and ethanol–basic buffer, pH 9, and stored at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Storage in the neutral environment (ethanol–water) lasted ten days and storage in the acidic and basic environments lasted eight days. The initial concentration

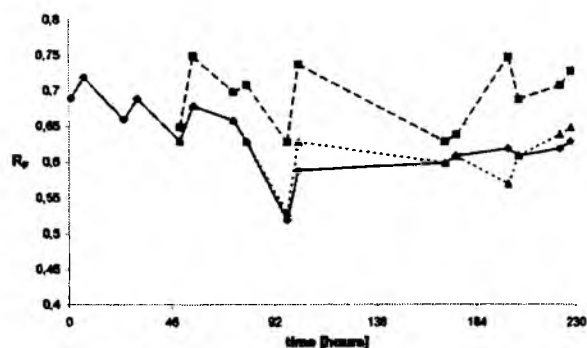


Figure 2

Dependence on sample storage time at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ of the retention, R_F , of *S*-(+)-ketoprofen dissolved in (◆) ethanol–water 7:3 (v/v), (■) ethanol–glacial acetic acid 7:3 (v/v), and (▲) ethanol–basic buffer, pH 9, 7:3 (v/v) ($R_F = f(t)$).

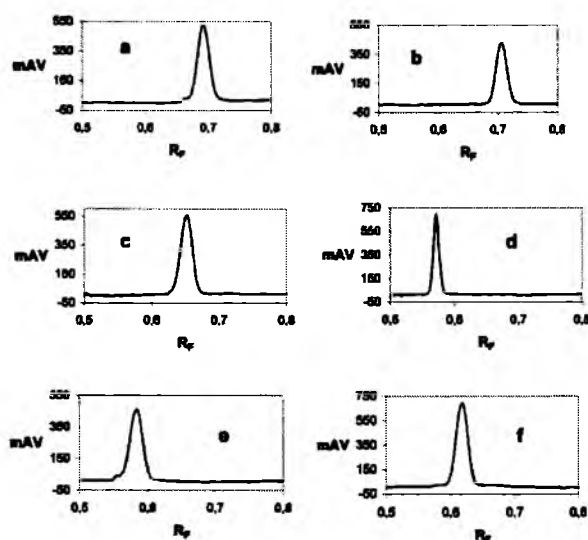


Figure 3

Sequence of densitometric concentration profiles (snapshots) for the ketoprofen solution in ethanol–water 7:3 (v/v) after storage at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for (a) 49.5 h, (b) 55.5 h, (c) 79.5 h, (d) 97.5 h, (e) 102.5 h, and (f) 203.5 h.

of *S*-(+)-ketoprofen in each freshly prepared solution was $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. In Figure 2 we show oscillatory changes of the retardation coefficient (R_F) obtained for the three different *S*-(+)-ketoprofen solutions in the course of ten and eight days. The observed oscillations of the R_F value are indisputably because of structural conversion of *S*-(+)-ketoprofen to its *R*-(-) antimer, because profens are well known for their stability in the sense that they do not undergo decomposition, oxidation, or any other similarly drastic structural transformation when stored in a solution. Moreover, the observed changes of the R_F value considerably surpass the chromatographic experimental error which is never higher than ± 0.02 .

The observed numerical values of the retardation coefficient (R_F) for ketoprofen dissolved in ethanol–water were oscillating within the range 0.52 ± 0.02 to 0.72 ± 0.02 . For ketoprofen dissolved in ethanol–glacial acetic acid the oscillation range was 0.63 ± 0.02 to 0.75 ± 0.02 . For ketoprofen dissolved in

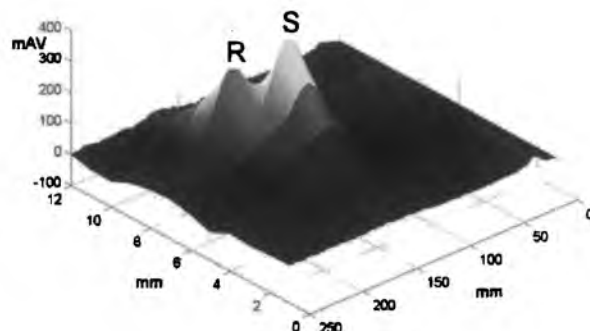


Figure 4

Three-dimensional representation of the two separated spots of *S*-(+) and *R*-(-) ketoprofen after two-dimensional development of the ketoprofen solution in ethanol–basic buffer, pH 9, 7:3 (v/v) stored for 26 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. The 3D picture was based on densitometric scans of the separated pair of the ketoprofen antimers taken at 1-mm intervals.

ethanol–basic buffer the oscillation range was 0.53 ± 0.02 to 0.65 ± 0.02 .

It can also be stated that the broadest range of R_F changes was observed with the ketoprofen sample dissolved in ethanol–water ($\Delta R_F = 0.20$). With ketoprofen dissolved in the acidic and basic media the range of changing R_F values was narrower and in both cases equal to $\Delta R_F = 0.12$. One more important observation was that the average R_F values originating from ketoprofen dissolved in the acidic medium were higher than those originating from the basic medium. This observation remains in conformity with our earlier findings [4] of hampering the oscillatory chiral conversion in acidic medium and the catalytic effect of the basic medium.

In Figure 3 a sequence of the six snapshots illustrates the changes of the maximum position and of the concentration profile for *S*-(+)-ketoprofen dissolved in ethanol–water and stored for over 200 h at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. In ethanol–acetic acid and ethanol–basic buffer, the oscillating positions of the ketoprofen peak maximum on the scale of the R_F values and the changing concentration profiles were analogous with those shown in Figure 3, although in the latter two cases – as already mentioned – the range of the R_F oscillations was narrower.

With *S*-(+)-ketoprofen, the oscillatory structural inversion is relatively fast, so we were virtually unable to record a one-dimensional densitogram showing two separated peaks of *S*-(+) and *R*-(-) ketoprofen. In most cases, we either recorded symmetric concentration profiles of the pure ketoprofen enantiomers (the lower R_F value valid for the *R*-(-) species and the higher R_F value valid for the *S*-(+) species [17]), or slightly asymmetric concentration profiles showing a significant quantitative predominance of one enantiomer over its antimeric counterpart.

In the two-dimensional development mode we managed to demonstrate the effect of the oscillatory chiral inversion of *S*-(+)-ketoprofen in the most direct way, simply by separating the two antimers (Figure 4). This result was obtained from the ketoprofen sample dissolved in the ethanol–basic buffer mixture and stored for 26 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Basic environments are known

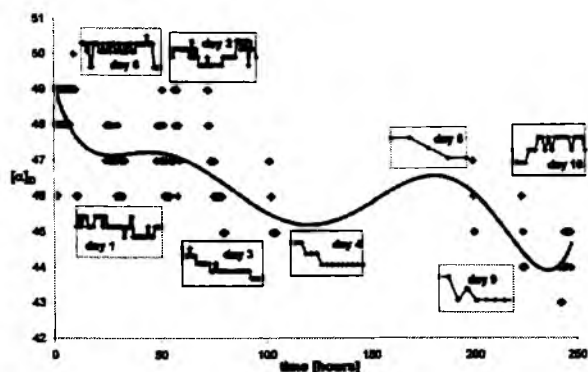


Figure 5

Oscillatory changes of the specific rotation, $[\alpha]_D$, of ketoprofen dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v) and stored for 10 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Windows illustrate oscillatory changes on selected measurement days and the solid line illustrates the general oscillatory trend over the 10-day period.

for their ability to catalyze keto–enol formation as an intermediate stage of chiral inversion and the 26 days long storage period before the successful separation is evidence of the relatively low overall rate of the investigated inversion process with ketoprofen.

Finally, it must be stated that the oscillatory chiral inversion of *S*-(+)-ketoprofen running in the solutions and reported in this section is almost certainly accelerated by intermolecular interactions between the investigated profen and silica gel. From the results of our earlier studies on the oscillatory chiral inversion of *S*-(+) and *R*-(-)-flurbiprofen [5] it became evident that the high specific surface area and microporous structure of silica gel can substantially accelerate the discussed process compared with an analogous process running in the bulk phase, i.e., outside the chromatographic system. Thus the quantitative results presented in this section ought to be viewed as resulting from two chemical processes, one running outside and another in the chromatographic system.

3.2 Polarimetric Measurements of the Specific Rotation $[\alpha]_D$

The specific rotation, $[\alpha]_D$, of the *S*-(+)-ketoprofen solution (concentration in ethanol–water $3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) was measured at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ over the course of ten days, several hours per day in 15-min intervals (except for the weekend, when no measurements were performed). The results obtained are shown in Figure 5.

Specific rotation, $[\alpha]_D$, of *S*-(+)-ketoprofen dissolved in ethanol–water, ethanol–glacial acetic acid, and ethanol–basic buffer, pH 9, concentration always $3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, was also measured for 360 min in 15-min intervals at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ and $22 \pm 2^\circ\text{C}$. At each working temperature, two series of the measurements were performed, one for unstirred solution and the other for solution stirred by ultrasonication. Specific rotation of *S*-(+)-ketoprofen showed oscillatory changes in both the unstirred and stirred solutions. Although the amplitude of the oscillations at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) was lower than at $9 \pm 2^\circ\text{C}$. The results of the measurements carried out at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ are shown in Figure 6.

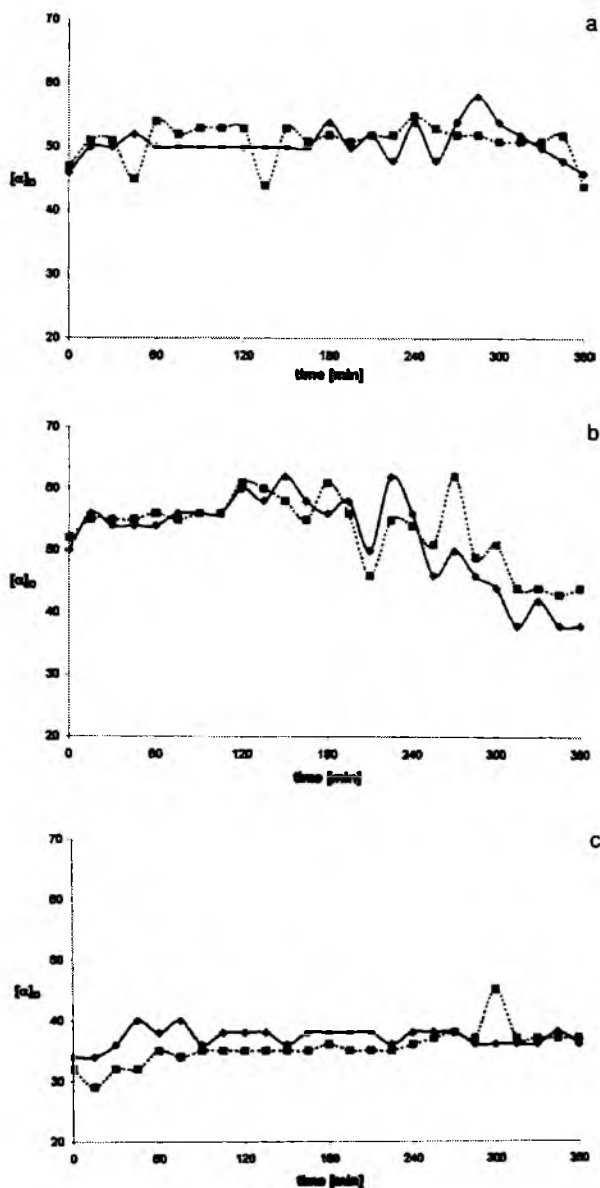


Figure 6

Comparison of the oscillations of the specific rotation, $[\alpha]_D$, of ketoprofen dissolved and stored for 360 min at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ in (a) ethanol–water 7:3 (v/v), (b) ethanol–glacial acetic acid 7:3 (v/v), and (c) ethanol–basic buffer, pH 9, 7:3 (v/v) without (dashed line) and with ultrasonication (solid line).

It is apparent from Figure 5 that the specific rotation of ketoprofen solution in ethanol–water measured for 10 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ was unstable and from the solid trend line a (vague) suggestion could be drawn that the $[\alpha]_D$ values were gradually heading toward zero degrees, i.e., toward full racemization of the profen. A plot analogous to that shown in Figure 5 had been published elsewhere [5] and convincingly illustrated the stepwise racemization of *S*-(+)-flurbiprofen. Comparison of these two plots certainly strengthens our conviction about the slow oscillatory racemization of ketoprofen in the course of its prolonged storage in the aqueous ethanol solution.

It is apparent from our earlier experimental results with the other profens and α -amino acids [7–9], that stirring of the samples can affect the observed oscillatory changes of $[\alpha]_D$, depending on the compound considered. From the results for ketoprofen illustrated in Figure 6 it can, however, be concluded that for this compound stirring does not perceptibly affect the observed amplitude of oscillations, if the unstirred ketoprofen samples are considered as references. This conclusion remains valid irrespective of the binary solvent employed in our experiment.

A factor which evidently affects the oscillations of $[\alpha]_D$ is the presence of the acid or base in the ketoprofen solution. The presence of acid enhances the amplitude of oscillations of the specific rotation (compared with the neutral ethanol–water solvent), as shown in Figure 6b. In contrast, the presence of the base not only suppresses the amplitude (Figure 6c), but also results in instantaneous lowering of the $[\alpha]_D$ values (in the presence of acid, lowering of the $[\alpha]_D$ values was observed after several hours only). The different effect of acid and base in the reaction medium is certainly because of the inhibiting effect of acids on keto–enol formation and the catalytic effect of bases on the same process, as demonstrated elsewhere [4] and already mentioned in this study.

Finally, it must be stated that – similar to the results originating from thin-layer chromatography – the data from polarimetry seem to be a result of the two different processes. One is certainly the chemical process of the spontaneous oscillatory in-vitro chiral inversion, running in the bulk phase of the polarimetric cell and the best proof of its occurrence is the gradual overall lowering of the specific rotation in the course of storage of the S-(+)-ketoprofen solution (Figure 5). The second process might be physical and consisting in temporary self-organization of ketoprofen molecules to form H-bonded supramolecular aggregates, also rotating the plane of the polarized light beam. In our earlier studies of S-(+)-ibuprofen and S-(+)-naproxen [1], the recorded $[\alpha]_D$ values occasionally surpassed not only the reference values for the S-(+) and the R-(–) species, but even by 360°, so the contribution from the molecular self-organization cannot be excluded with S-(+)-ketoprofen also. Nevertheless, comparison of the TLC results with those from polarimetry (the standard tool in the investigation of chirality) leads to the conclusions that:

- similar to the other profen drugs, S-(+)-ketoprofen also undergoes spontaneous chiral in-vitro inversion; and
- thin-layer chromatography is a reliable enough tool contributing to the discovery of the non-trivial oscillatory mechanisms of the organic reactions.

4 Conclusion

Elucidation of the molecular mechanism of the oscillatory chiral inversion of profens and α -amino acids is certainly a scientific challenge. In our earlier paper [8] we proposed a simple yet experimentally well founded kinetic–diffusive mechanism of such oscillatory chiral inversions. Further efforts with the objective of improving the originally proposed oscillator (involving two linked Templators) are in progress.

The results showing the oscillatory in-vitro chiral inversion of S-(+)-ketoprofen presented in this report are meant to expand the already existing database, mostly originating from our labo-

ratory, and to document the universality of this process for α -substituted chiral propionic acid derivatives (in the first instance profen drugs and α -amino acids).

Organic reactions with non-linear dynamics, for example the oscillatory in-vitro chiral inversion of the propionic acid derivatives, are relatively rare and, moreover, quite difficult to discover and then to monitor, basically because they are not color reactions. An invaluable role played by thin-layer chromatography with densitometric detection as a modern, flexible and handy experimental tool in this kind of mechanistic study is noteworthy.

Acknowledgement

The authors wish to thank Merck KGaA (Darmstadt, Germany) for supplying the TLC plates used in our experiments.

References

- [1] M. Sajewicz, R. Piętko, A. Pieniak, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **15** (2005) 131–149.
- [2] M. Sajewicz, R. Piętko, A. Pieniak, and T. Kowalska, *J. Chromatogr. Sci.* **43** (2005) 542–548.
- [3] M. Sajewicz, R. Piętko, A. Pieniak, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **29** (2006) 2059–2069.
- [4] M. Sajewicz, R. Piętko, G. Drabik, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **29** (2006) 2071–2082.
- [5] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, Ł. Wojtal, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **18** (2007) 226–237.
- [6] Y. Xie, H. Liu, and J. Chen, *Int. J. Pharm.* **196** (2000) 21–26.
- [7] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.* **21** (2008) 43–47.
- [8] M. Sajewicz, M. Gontarska, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **31** (2008) 1986–2005.
- [9] M. Sajewicz, D. Kronenbach, D. Słazek, M. Wróbel, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **31** (2008) 2006–2018.
- [10] E. Peacock-Lopez, D.B. Radov, and C.S. Flesner, *Biophys. Chem.* **65** (1997) 171–178.
- [11] L.L. Tsai, G.R. Hutchinson, and E. Peacock-Lopez, *J. Chem. Phys.* **113** (2000) 2003–2006.
- [12] V. Wsol, L. Skalova, and B. Szotakova, *Curr. Drug Metab.* **5** (2004) 517–533.
- [13] S. Weiner, Z. Kustanovich, E. Gil-Av, and W. Traub, *Nature* **287** (1980) 820–823.
- [14] M. Sinibaldi, G.A. Goodfriend, G. Barkay, S. Marchese, and E. Gil-Av, *Geoarcheology* **14** (1999) 441–454.
- [15] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/ALDRICH/471909>
- [16] M. Sajewicz, M. Gontarska, M. Wróbel and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **30** (2007) 2193–2208.
- [17] H.Y. Aboul-Enein, M.I. El-Awady, and C.M. Heard, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32** (2003) 1055–1059.

Ms received: February 11, 2008

Accepted: July 8, 2008

Short Communication

On the Spontaneous Abiotic Peptization of Phenylglycine in an Aqueous Medium

M. SAJEWICZ, M. GONTARSKA, D. KRONENBACH, AND T. KOWALSKA*

Institute of Chemistry, Silesian University,
9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland
E-mail: kowalska@us.edu.pl

Summary. In this report we provide thin-layer chromatographic evidence that phenylglycine dissolved in 70% aqueous ethanol and kept at ambient temperature (22°C) undergoes spontaneous peptization, as additionally confirmed by use of the biuret test. It was also shown that an important precondition for instantaneous peptization of phenylglycine is the simultaneous presence of the *R* and *S* antimers in solution, and the most spectacular peptization effect is obtained with racemic *R,S*-phenylglycine. An assumption is made that polycondensation of phenylglycine results from its ability to undergo spontaneous oscillatory chiral conversion and can be regarded as a step following enolization, and competitive with chiral conversion.

Key Words: phenylglycine, abiotic peptization, oscillatory chiral conversion

Introduction

The origin of peptides and proteins on Earth is a matter of scientific speculation, as are numerous related questions, for example homochirality. The general problem of amino acid peptization is the thermodynamically and kinetically unfavourable process of dehydration [1]. It is believed that to overcome the thermodynamic barrier, a variety of catalysts and external energy are necessary – a catalyst can reduce the activation energy of a chemical reaction and the external energy may promote self-condensation or cross-condensation of amino acids.

Spontaneous abiotic polycondensation of amino acids in aqueous solutions is still regarded as hardly possible. For example, results from quantum

chemical calculations [2] suggest that prebiotic peptization could involve molecules with carbon, oxygen, and/or nitrogen atoms replaced by their heavier analogues (i.e., silicon, sulphur, and phosphorus, respectively). It was computationally proved that peptization of heteroatom(s)-containing molecular analogues is energetically more favourable than that of 'normal' amino acids.

In a peptization experiment run under relatively mild conditions [3] it was established that low-energy ion irradiation is essential and it could have played crucial role in prebiotic synthesis of oligopeptides.

In this study, thin-layer chromatographic evidence is provided for spontaneous peptization of *R*-phenylglycine, *S*-phenylglycine, and racemic *R,S*-phenylglycine in 70% aqueous ethanol stored at 22°C (i.e. under the mild abiotic conditions). Additional experimental evidence is from a biuret test and polarimetry. Finally, assumptions are made about the molecular mechanism of this process.

Experimental

Reagents

R-Phenylglycine and *S*-phenylglycine of analytical purity grade were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA; cat. nos P25485 and 237647, respectively). Phenylglycine racemate and scalemates were prepared by mixing optically pure *R* and *S* antimers in molar proportions of 1:1, 0.75:0.25, and 0.25:0.75, respectively.

For the TLC experiment, we used solutions of *R*-phenylglycine, *S*-phenylglycine, and *R,S*-phenylglycine in 70% aqueous ethanol. The concentration of each optically pure enantiomer was 0.5 g L⁻¹ (3.3×10^{-3} mol L⁻¹). Concentrations of the two antimers in the racemic and scalemic mixtures, respectively, were such as to make the total concentration of phenylglycine equal to 0.5 g L⁻¹ (3.3×10^{-3} mol L⁻¹). In the polarimetric experiment, we used a solution of *R*-phenylglycine in 70% ethanol; its concentration was 0.5 g L⁻¹ (3.3×10^{-3} mol L⁻¹).

Thin-Layer Chromatography (TLC)

Chromatography was performed on 20 cm × 20 cm commercial glass plates coated with 0.25-mm layers of silica gel (Merck, Darmstadt, Germany; #1.05715). Before use, the plates were pre-developed with methanol-water 9:1 (*v/v*) to remove possible contaminants from the plate surface. They were then dried in ambient air (22°C) for 3 h. The pre-developed, dried plates

were impregnated by dipping them for 10 min in an aqueous solution of 5.01×10^{-2} mol L⁻¹ copper(II) acetate (analytical grade; POCh, Gliwice, Poland). Finally, the impregnated plates were dried for 1 h in a stream of warm air from a hair dryer.

The phenylglycine solutions in 70% aqueous ethanol were applied to the plates in 20- μ L volumes 1.5 cm above the lower edge of the plate by use of an AS 30 autosampler (Desaga, Heidelberg, Germany). One-dimensional development was then performed at 22°C with dioxane–water 9:1 (*v/v*) as mobile phase. Chromatograms were developed to a distance of 15 cm then dried at ambient temperature for 3 h. Finally, each chromatographic lane was densitometrically scanned in the direction of development. Several randomly selected chromatograms were also scanned along the starting line in the direction perpendicular to development.

Densitograms were acquired with a Desaga (Heidelberg, Germany) model CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software. Concentration profiles of the development lanes were recorded in reflectance mode, in ultraviolet (UV) light from the deuterium lamp, at 200 nm. The dimensions of the scanning rectangular light beam were 0.1 mm \times 1.0 mm. Maxima of the respective concentration profiles were used for calculation of retardation coefficients, R_F .

Biuret Test

The biuret test, first described in 1961 [4], is now a standard analytical procedure enabling easy detection of the presence of peptides and proteins in many liquids (including blood and urine—it is widely used in medical analysis). In the biuret test, the Cu²⁺ ion forms complexes with at least two peptide groups; as a result of this the system changes colour from blue (characteristic of the solvated copper ions) to pink (characteristic of dipeptides) or violet (characteristic of higher peptides).

The biuret test was performed by adding 5 mL biuret reagent to 5 mL *R*-phenylglycine, 5 mL *S*-phenylglycine, or 5 mL racemic *R,S*-phenylglycine solution in 70% aqueous ethanol (amino acid concentration 0.5 g L⁻¹ (3.3×10^{-3} mol L⁻¹)). Biuret reagent contained 7.5 g CuSO₄·5H₂O, 100 mL 50% (*w/w*) NaOH, and water, and the total volume was diluted to 1 L. In this solution, the concentration of Cu(II) ions is 3.0×10^{-2} mol L⁻¹ and the concentration of NaOH is 2.5 mol L⁻¹.

Polarimetry

Specific rotation ($[\alpha]_D$) was measured for the sample of *R*-phenylglycine using a Carl Zeiss (Jena, Germany) Polamat A polarimeter. The optical path length of the measurement cell was exactly 10 cm (1 dm) and the volume of solution was ca. 1 mL. Specific rotation was calculated by use of the equation:

$$[\alpha]_D = 100 \alpha / cd \quad (1)$$

where α is the measured rotation (in angle degrees), D is the wavelength used (589 nm, which corresponds to the sodium D line), c is the concentration of the compound in g per 100 mL solution, and d is the measured sample thickness in dm. The specific rotation of *R*-phenylglycine dissolved in water at ambient temperature is -110.7° [5]. For *R*-phenylglycine freshly dissolved in 70% aqueous ethanol, we measured the specific rotation as -94.7° .

In our experiment, a solution of *R*-phenylglycine was stored for 8 days at 22°C and measurements were conducted for periods of several hours per day at 15-min intervals.

Results and Discussion

Thin-Layer Chromatography (TLC)

The outcome of the thin-layer chromatographic experiment proved rather surprising. Densitograms revealed that optically pure *R*-phenylglycine and *S*-phenylglycine migrated relatively quickly to give R_F values in the range 0.39 to 0.46. However, racemic *R,S*-phenylglycine barely moved from the origin (with only a tiny peak observed at $R_F \approx 0.40$). When this experiment was repeated at 24-hourly intervals for 12 days, using the stepwise ageing amino acid solutions, the results obtained remained almost unchanged (Fig. 1).

To emphasize this spectacular result, selected chromatograms from different days of the experiment were scanned along the starting line in the direction perpendicular to development (Fig. 2). In this way, a complementary picture was acquired to better show immobility of racemic *R,S*-phenylglycine on the starting line. Incidentally, the plate developed on day 1 showed not only immobilized *R,S*-phenylglycine, but also *S*-phenylglycine.

Fig. 3 shows the 3D chromatogram of the five different phenylglycine samples: (i) pure *R*-phenylglycine, (ii) pure *S*-phenylglycine, (iii) racemic *R,S*-phenylglycine, (iv) scalemic phenylglycine (0.75:0.25), and (v)

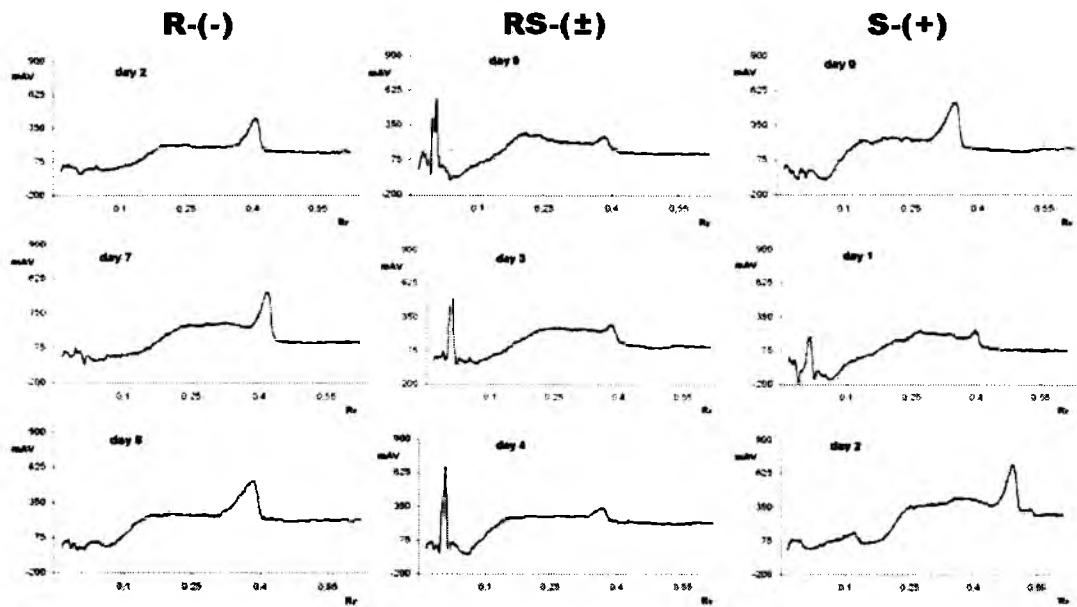


Fig. 1. Densitograms showing the dependence of the concentration profiles of *R*-phenylglycine, *S*-phenylglycine, and racemic *R,S*-phenylglycine on storage period. The amino acids were dissolved in 70% aqueous ethanol

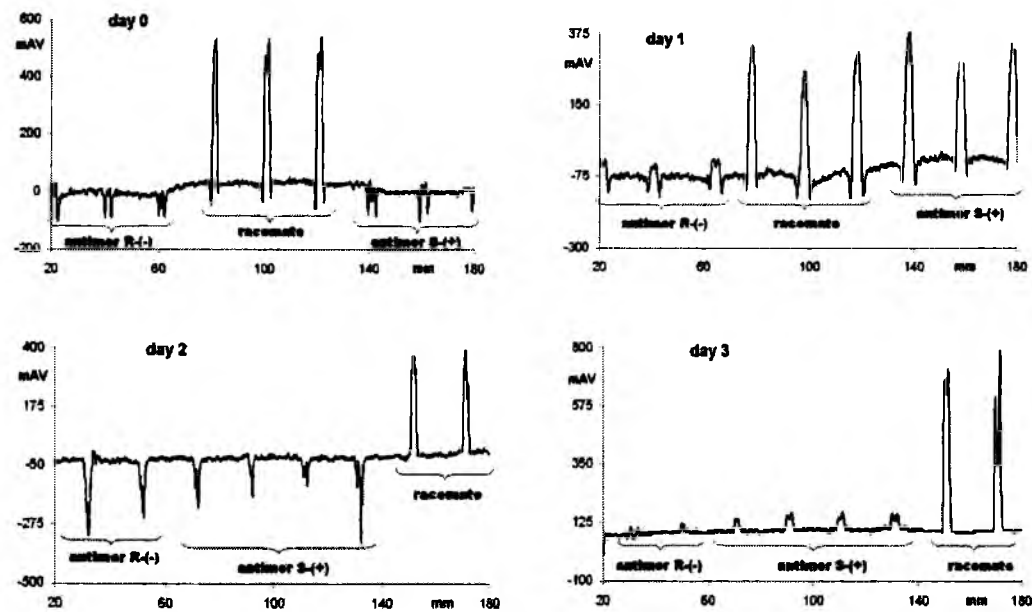


Fig. 2. Densitometrically scanned starting line on the chromatograms originating from days 0, 1, 2, and 3 of the experiment (with the marked starting points of *R*-phenylglycine, *S*-phenylglycine, and racemic *R,S*-phenylglycine)

scalemic phenylglycine (0.25:0.75). From this figure it is apparent that pure *R*-phenylglycine (lanes 1 and 2) and pure *S*-phenylglycine (lanes 9 and 10) move upward the chromatographic plate whereas for racemic *R,S* phenylglycine (lanes 3 and 4) and the two scalemates (lanes 5–8) a substantial part of each spotted sample remains fixed at the origin. With the two scalemates it is also evident that the immobilized part of the sample corresponds to equimolar proportions of the *R* and *S* antimers, whereas excess *R* enantiomer (lanes 5 and 6) or *S* enantiomer (lanes 7 and 8) moves up the chromatographic plate.

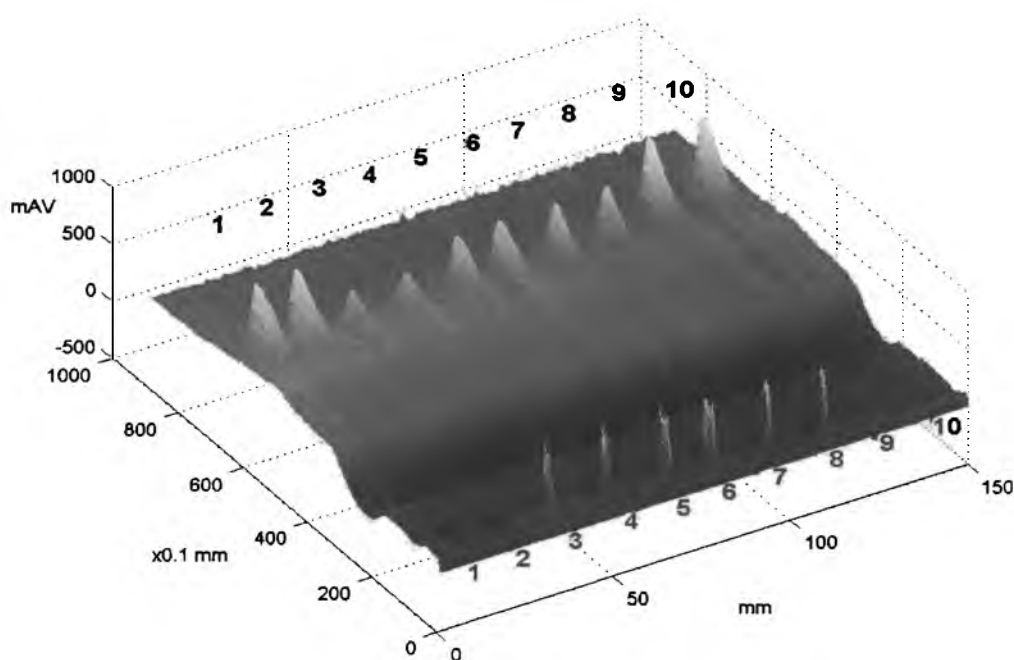


Fig. 3. 3D densitogram obtained from *R*-phenylglycine, *S*-phenylglycine, and racemic and scalemic phenylglycine mixtures. Lanes 1 and 2: *R*-phenylglycine; lanes 3 and 4: racemic *R,S*-phenylglycine; lanes 5 and 6: scalemic phenylglycine (*R:S*, 0.75:0.25); lanes 7 and 8: scalemic phenylglycine (*R:S*, 0.25:0.75); lanes 9 and 10: *S*-phenylglycine

Thin-layer chromatographic results suggest that for racemic *R,S*-phenylglycine, almost instantaneous peptization occurs and, because of the greater molecular weight of the peptides (compared with that of the single amino acid molecule), the peptides do not move from the origin. The same does not seem to be true for optically pure samples of the *R* and *S* antimers. From the TLC results alone it is not clear whether peptization—if any—still occurs in the bulk solution or only on the solid surface of the silica gel layer. To answer these questions we performed a biuret test, the standard proce-

ture for detection of peptides, to check for the presence of peptides in the bulk samples investigated.

Biuret Test

The biuret test was performed on solutions of pure *R*-phenylglycine, pure *S*-phenylglycine, and racemic *R,S*-phenylglycine in 70% ethanol, each sample after a three day storage period. Photographs of test tubes showing the outcome of the biuret test are shown in Fig. 4. The pink-violet colour developed in all three tubes, indicating the presence of peptides therein. Peptization yields are substantially different for the three samples. The highest yield of peptides is observed with racemic *R,S*-phenylglycine (Fig. 4c); a substantially lower yield was obtained with *S*-phenylglycine (Fig. 4b), and a trace amount was obtained from *R*-phenylglycine (Fig. 4a).

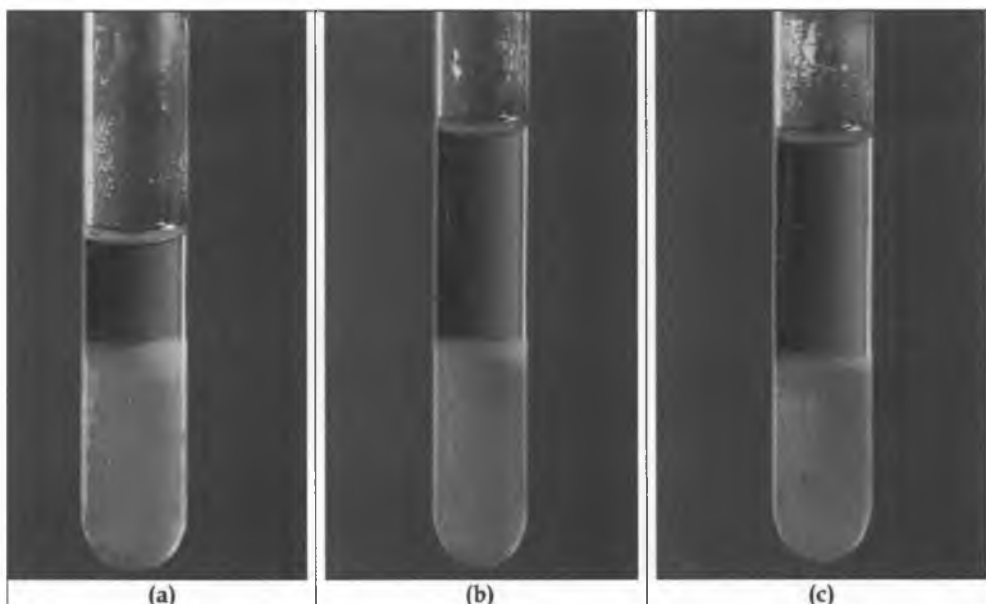


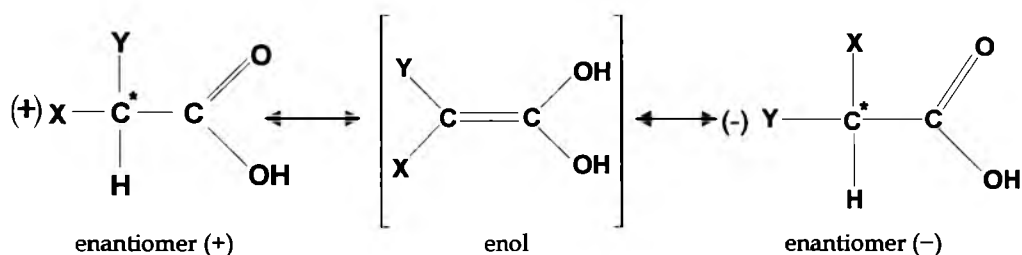
Fig. 4. Test tubes showing the colour outcome of the biuret test on 70% ethanol solutions of (a) *R*-phenylglycine, (b) *S*-phenylglycine, and (c) racemic *R,S*-phenylglycine after storage for three days

The outcome of the biuret test corresponds well with the thin-layer chromatographic results. Comparison of the chromatographic immobility of racemic *R,S*-phenylglycine with the most intense pink-violet colour in the respective test tube is indicative of almost instantaneous peptization of this

equimolar antimer mixture. With *R*-phenylglycine, peptization yield is apparently the lowest, as indicated by the trace pink-violet colour. This result is in good agreement with the small peaks at the chromatogram's origin on days 2 and 3 of storage of the *R*-phenylglycine sample (Fig. 2). These small peaks most probably reflect very modest yet traceable peptization yield as an outcome of chiral conversion of *R*-phenylglycine. *S*-Phenylglycine is an intermediate case between the *R* antimer and the racemate. Consequently, its spontaneous chiral conversion to *R*-phenylglycine progresses more rapidly than conversion of *R*-phenylglycine to *S*-phenylglycine, which results in higher peaks at the chromatogram's origin on days 2 and 3 of sample storage (Fig. 2), and in a more intense pink-violet colour in the test tube (Fig. 4b) than with the *R* antimer.

Polarimetry

In our earlier studies, we demonstrated spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion with multiple α -substituted carboxylic acids dissolved in 70% aqueous ethanol, and in the first instance with profens [6] and α -amino acids [7-9]. In all these cases, experimental evidence was furnished as a plot of oscillatory time changes of a sample's specific rotation ($[\alpha]_D$). The mechanism of chiral conversion of α -substituted carboxylic acids can be summarized by the following scheme [10]:



where X = NH₂, OH, C_nH_{2n+1}, etc., and Y = Ph, Ar, etc.

In polarimetric investigations, *R*-phenylglycine is characterized by less dynamic oscillatory chiral conversion than its *S* antimer, although it undergoes the same process. In Fig. 5, we show the oscillatory changes of specific rotation ($[\alpha]_D$) of *R*-phenylglycine, as monitored on individual days of sample storage (windows), and the change trend (solid line) in the course of the eight days of carrying out the measurements. Although these results are certainly not evidence of rapid racemization, they illustrate oscillatory

changes of the quantitative proportions of the *R* and *S* antimers. Polarimetrically confirmed was the appearance of the *S* antimer, proving that even with the more stable *R* enantiomer, some of its antimer is present in the solution, which seems an important precondition of rapid peptization of phenylglycine.

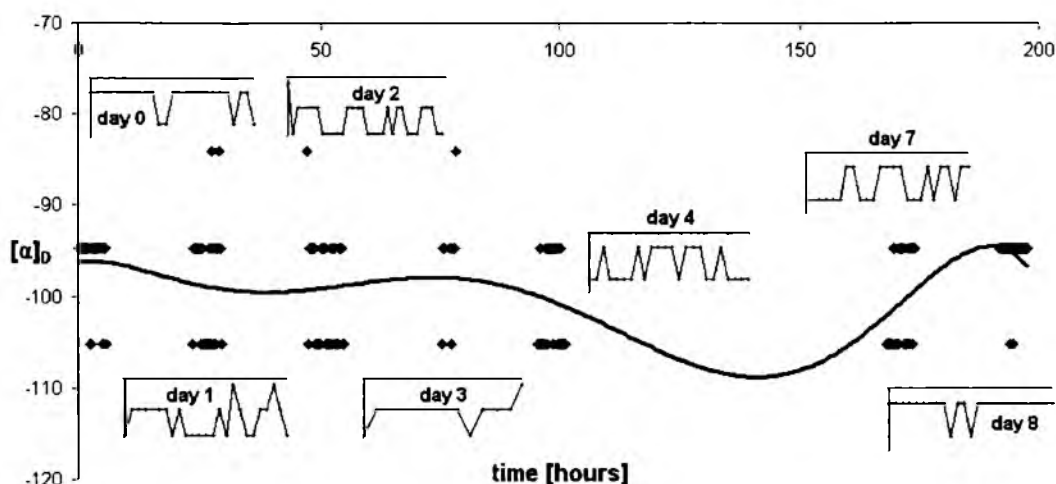


Fig. 5. Oscillatory changes of the specific rotation ($[\alpha]_D$) as a function of sample storage time for *R*-phenylglycine dissolved in 70% aqueous ethanol and kept at 22°C. Windows illustrate oscillatory changes on selected measurement days and the solid line illustrates the general oscillatory trend over the entire storage period

Conclusions

As far as we are aware, this is the first literature report of the spontaneous peptization of phenylglycine at ambient temperature in an abiotic aqueous medium and resulting in an instantaneous formation of phenylglycine peptides.

Thin-layer chromatography proved a convenient experimental tool proving that simultaneous presence of the *R* and *S* antimers was a necessary precondition for the peptization discussed.

A crucial role in this process seems to be played by spontaneous oscillatory chiral conversion of phenylglycine. Peptization probably occurs at the enolization stage, as a process which competes with chiral conversion.

***In vitro* Chiral Conversion, Phase Separation, and Wave Propagation in Aged Profen Solutions**

Mieczysław Sajewicz,¹ Roman Wrzalik,² Monika Gontarska,¹
Dorota Kronenbach,¹ Marcin Leda,³
Irving R. Epstein,³ and Teresa Kowalska¹

¹Institute of Chemistry, University of Silesia, Katowice, Poland

²Institute of Physics, University of Silesia, Katowice, Poland

³Chemistry Department, Brandeis University, Waltham, MA, USA

Abstract: We have shown, earlier, that profens, i.e., 2-arylpropionic acids can undergo oscillatory *in vitro* chiral conversion, exhibiting oscillatory changes in the chromatographic retention parameter (R_F) and the specific rotation ($[\alpha]_D$) for periods of up to two weeks after preparation of the solutions in aqueous ethanol. Here, we examine the oscillatory chiral conversion of *S*-(+)-ibuprofen and *S,R*-(±)-ketoprofen dissolved in 70% aqueous ethanol and stored in tightly closed colorless glass vials for one year. During that time, each initially homogenous, transparent profen solution separates into two immiscible layers, one clear and the other turbid. Employing chiral thin layer chromatography, high performance liquid chromatography with diode-array detection, gas chromatography, and Raman spectroscopy, we find that both samples undergo chiral conversion to yield a strong predominance of the *R*-(-) antimer. Additionally, microscopy reveals characteristic spatial patterns in both layers of the demixed ibuprofen and ketoprofen solutions. We use a model proposed earlier for the homogeneous oscillatory interconversion of the *S* and *R* profens involving two linked templates to simulate microscopic spatial patterns analogous to those observed in the solutions investigated here.

Keywords: Chiral conversion, Enantioseparation of profens, Microscopy, Polarimetry, Raman spectroscopy, Simulation of chiral conversion, TLC

Correspondence: Teresa Kowalska, Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland. E-mail: kowalska@us.edu.pl

INTRODUCTION

The remarkable phenomenon of spontaneous *in vitro* oscillatory chiral conversion of selected profens and amino acids has been the focus of our attention for some time. In papers,^[1-3] we reported on the chiral conversion of *S*-(+)-ibuprofen, *S*-(+)-naproxen, *S,R*-(±)-2-phenylpropionic acid, *S*-(+)-flurbiprofen, *R*-(-)-flurbiprofen, and *S,R*-(±)-ketoprofen. Our investigations were carried out mainly by means of thin-layer chromatography (TLC) and polarimetry, and occasionally with the aid of such complementary measuring techniques as viscosimetry, high performance liquid chromatography (HPLC), and ¹H NMR spectrometry. In a paper,^[4] we reported the analogous behavior of L-α-phenylalanine. There, we introduced a kinetic-diffusive model of the oscillatory chiral conversion, derived from the templator model of Peacock López and collaborators,^[5,6] which can be applied to amino acids structurally derived from propionic acid as well as to the profens. All our investigations were carried out with dilute solutions (10^{-2} – 10^{-3} M in 70% aqueous ethanol) for periods of several hours or several days, depending on the measuring technique employed. The ability of all investigated chiral compounds to undergo immediate and spontaneous *in vitro* chiral conversion has thus been reliably established.

By chance, two samples, *S*-(+)-ibuprofen and *S,R*-(±)-ketoprofen, dissolved in 70% aqueous ethanol in tightly stoppered vials, were stored in our laboratory at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for one year. By means of HPLC/DAD, we confirmed that, in the course of this storage period, neither ibuprofen nor ketoprofen decomposed or transformed to another product in chromatographically measurable amounts. This result is in agreement with numerous claims in the pharmaceutical literature as to the long-term durability of profen solutions. This stability allows commercial forms of many profens to be sold not only as tablets, but also as ready-made injections, ointments, and syrups. However, in the course of the one-year storage period, the colorless, transparent, and initially homogenous solutions of *S*-(+)-ibuprofen and *S,R*-(±)-ketoprofen in 70% ethanol demixed to give two immiscible layers which form an opalescent emulsion upon shaking. The aim of this study is to determine the conversion yields after the one-year storage period and to expand our earlier model of the oscillatory chiral conversion of profens and amino acids^[4] based on the new experimental data.

EXPERIMENTAL

Analytes

Samples of *S*-(+)-ibuprofen (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA; cat. # I-106) and *S,R*-(±)-ketoprofen (Sigma–Aldrich; cat. # K1751) were

prepared in 70% aqueous ethanol at concentrations of 5 mg mL^{-1} (ca. $2.4 \times 10^{-2} \text{ M}$) and 0.1 mg mL^{-1} (ca. $3.9 \times 10^{-4} \text{ M}$), respectively. Both profens and ethanol were of analytical purity, and the water was double distilled and de-ionized. Solutions were stored on the laboratory shelf in tightly closed colorless glass vials at $22 \pm 2^\circ \text{C}$ for one year.

Thin-Layer Chromatography (TLC)

We used chiral TLC with densitometric detection to quantify the proportions of the two ibuprofen and ketoprofen antimers in the upper and lower layers of the demixed solutions. The chromatographic conditions are described in detail in earlier papers.^[1,2] As stationary phase, we used commercial glass plates precoated with silica gel (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; cat. # 1.05715) and impregnated with L-arginine. As mobile phases, we used acetonitrile–methanol–water (5:1:1, v/v) for ibuprofen and acetonitrile–water (5:1, v/v) for ketoprofen. In both cases, the mobile phases were acidified with a few drops of glacial acetic acid to keep their pH below 4.8. 5- μL aliquots of the upper and lower layers of each profen solution were applied to the chromatographic plate, and then the chromatograms were developed.

The densitograms were acquired with a Desaga (Heidelberg, Germany) Model CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software. Scanning of the chromatograms was carried out at wavelengths $\lambda = 210 \text{ nm}$ (ibuprofen) and 252 nm (ketoprofen). With each profen, 30 mm wide tracks were scanned in 1-mm intervals.

High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC/DAD)

HPLC/DAD analysis of the ibuprofen and ketoprofen solutions after one year of storage was carried out with a P580A LPG model liquid chromatograph, equipped with a Gina 50 model autosampler and a UVD340 V DAD model detector (GynkoteK/Dionex, Germering, Germany); column: RP-18 (LichroCART cartridge with LiChrospher 100, $5 \mu\text{m}$; 250 mm, 4 mm i.d.), cat. # 1.50983.0001, Merck. As mobile phase, we used methanol–water (8:2, v/v; flow rate: 0.8 mL min^{-1}). The analyses were run in the isocratic mode.

Gas Chromatography (GC)

We used GC to assess the difference in ethanol concentrations for the mixed solvent (ethanol–water) in the upper and lower layers of the

ibuprofen solution. In the case of ketoprofen, the lower layer was too viscous to perform a quantitatively accurate comparison.

Experiments were performed with a Carlo Erba Instruments (Rodano, Milan, Italy) HRGC 5300 series capillary gas chromatograph with on-column injection and flame ionization detection (FID). Isothermal chromatography was performed at 80°C.

Analyses were run on a capillary column (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 30 m long, internal diameter 0.32 mm, with DB-Wax stationary phase and a film thickness of 1 μm . Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 0.80 mL min⁻¹. The analyzed samples were 0.1- μL aliquots of the upper and lower layers of the demixed ibuprofen solution. Acquisition and immediate processing of the chromatographic data were achieved by use of ChromCard (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) software.

Raman Spectroscopy

Raman spectra were recorded using a LabRam System spectrometer (Jobin Yvon Horiba, USA/France) at room temperature. Argon-ion laser light of 514.5 nm was used to excite the spectra. The power at the sample was below 5 mW. To eliminate the Rayleigh line, the scattered light was passed through a holographic notch filter with a cutoff at 200 cm⁻¹. The Raman spectra were recorded in zero degree geometry in the range 300–3800 cm⁻¹ with a spectral resolution of 3.5 cm⁻¹. A collection time of 20 s and an accumulation of 4 scans were chosen. The monochromator was calibrated using a silicone plate (520.7 cm⁻¹).

Microscopy

In the microscopic studies, we used an Olympus BX51 model research polarizing microscope in non-polarizing mode. Microliter volumes of the upper and lower layers of the demixed ibuprofen and ketoprofen solutions were sandwiched between two flat optical windows. The gap between the windows was 0.16 mm, which was the thickness of the glass spacer placed between the windows. Snapshots were taken with a Nikon Coolpix 990 model digital camera, and movies were taken with a JVC GZ-MG26E digital camera. The microscopic magnifications were 100x and 500x. The temperature was 22°C.

RESULTS AND DISCUSSION

Visual inspection of the two vials, one containing a solution of ibuprofen and the other an analogous solution of ketoprofen (both solutions

prepared in 70% aqueous ethanol), showed that, in the course of one year, both originally homogenous, colorless, transparent liquids demixed to give two colorless, immiscible layers. With ibuprofen, the upper layer was turbid and the lower layer was transparent; with ketoprofen, the reverse effect was observed (i.e., the lower layer was turbid and the upper layer was clear). Shaking of the contents of each vial resulted in a colorless emulsion, which slowly settled to reconstitute the two separate liquid moieties.

We first analyzed the upper and lower layers in each vial by HPLC/DAD in a non-chiral chromatographic system. We wanted to establish whether the profens decomposed and/or transformed to other product(s) in the course of the storage period. The chromatograms and the accompanying UV spectra of the chromatographic bands confirmed the sole presence of ibuprofen and ketoprofen, respectively, in both layers, and they did not reveal any byproducts that might originate from decomposition, oxidation, or chemical condensation of the starting material (within the detection limits of our measuring technique). Thus, we assumed that the only process occurring within the profen samples in the course of the long storage period was the spontaneous *in vitro* chiral conversion.

In order to confirm this hypothesis, we enantioseparated the antimers contained in each layer by chiral TLC, using the working conditions described earlier.^[1,2] The results obtained are summarized in Table 1 and in Fig. 1. In Fig. 1 a–d, we present four 3D densitograms from the upper and lower layers, respectively, of the ibuprofen and ketoprofen solutions.

The TLC results allowed us to estimate the relative concentrations of profens in the two layers, but it was impossible to measure the respective volumes of the two layers due to the small volumes of the samples and the tendency of the layers to mix to form an emulsion. We also roughly quantified the proportions of the two antimers in each layer based on the fact that, in the TLC systems, *R*-(–) profens migrate slower than their *S*-(+) counterparts.^[7] The results given in Table 1 can be considered as semi-quantitative only, basically due to the sticky, viscous nature of the samples, which made it difficult to sample them precisely.

With ibuprofen solution, it was established that the total concentration of profen (sum of *R*-(–) and *S*-(+)) in the upper layer was ca. 1.9 times higher than in the lower layer. With ketoprofen solution, the concentration in the lower layer was ca. 2.3 times richer in total ketoprofen than the top layer. The enantiomeric excess of *R*-(–)-ibuprofen in the upper layer was ca. 80%, and in the lower layer, 50%. The enantiomeric excess of *R*-(–)-ketoprofen in the upper layer was ca. 10%, and in the lower layer ca. 92%. In Table 1, quantitative proportions of the two profen antimers in each layer are presented as a percent contribution from

Table 1. Thin-layer chromatographic quantification of the upper and lower layers of one year old solutions of ibuprofen and ketoprofen in 70% aqueous ethanol

Profen	Layer	Unitless proportions of total profen per layer volume unit	R_F		Contents of the two antimers per layer [%]		Enantiomeric excess of $R(-)$ {ee}* [%]
			$R(-)$	$S(+)$	$R(-)$	$S(+)$	
Ibuprofen	Upper	1.9	0.74	0.88	90	10	80
	Lower	1.0	0.72	0.88	75	25	50
Ketoprofen	Upper	1.0	0.69	0.98	55	45	10
	Lower	2.3	0.68	0.98	96	4	92

* enantiomeric excess (ee) = $((R-S)/(R+S)) \times 100\%$.

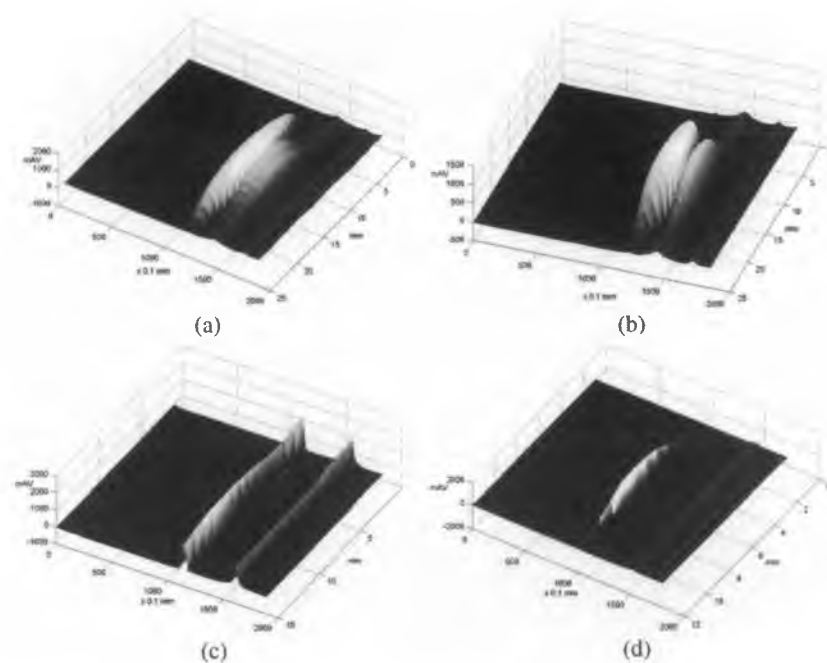


Figure 1. 3D densitogram of (a) the upper layer of the ibuprofen solution; (b) the lower layer of the ibuprofen solution; (c) the upper layer of the ketoprofen solution; and (d) the lower layer of the ketoprofen solution.

each antimer. The R_F values of the S -(+) and R -(−) antimers of the two profens coincide well with those reported in our earlier papers.^[1,2]

By means of GC, we compared the ethanol concentrations of the upper and lower layers of the ibuprofen solution. Similar evaluation was impossible with ketoprofen, due to the high viscosity of the lower ketoprofen layer and the resultant plugging of the syringe. The ethanol concentration of the lower ibuprofen layer was ca. 1.6 times higher than that of the upper layer (equivalently, the relative amount of water in the upper layer was higher than in the lower layer). We could only establish semiquantitatively that, with ketoprofen, the lower layer was richer in water. Although ibuprofen and ketoprofen are considerably more soluble in ethanol than in water, in the binary (EtOH-H₂O) solvent, we find that their concentration is higher in the layer richer in water. This surprising observation apparently has to do with hydrophilic interactions, which depend on the effectiveness of intermolecular solute–water hydrogen bonds.^[8]

Thin-layer chromatographic and polarimetric evidence of the spontaneous oscillatory chiral conversion of S -(+)-ibuprofen and S,R -(±)-ketoprofen was presented in earlier papers.^[1,2] In those studies, the

experimental results were collected in the course of several days (TLC) or several hours (polarimetry) after preparation of the fresh profen solutions in 70% aqueous ethanol. Our results, combined with data from the literature,^[9] lead to the notion that the chiral conversion involves an enol tautomer as an intermediate. In an earlier article,^[10] we demonstrated the gelation of profens, which appears to play a role in their oscillatory chiral conversion, by introducing the possibility of coupling differential diffusion to the kinetics.

We also examined each layer of the two demixed profen solutions with a microscope. In both layers of each individual solution, we noticed spatial patterns resembling those described earlier in the case of the other oscillatory reactions, e.g., in other published papers.^[11,12] As examples, in Fig. 2 we present selected spatial patterns recorded in the upper ibuprofen layer, and in Fig. 3 those recorded in the upper and lower ketoprofen layers. The diameters of the circular patterns shown in these figures typically range from several dozen to over 100 μm . The layer with the lower concentration of a given profen generally showed considerably fewer

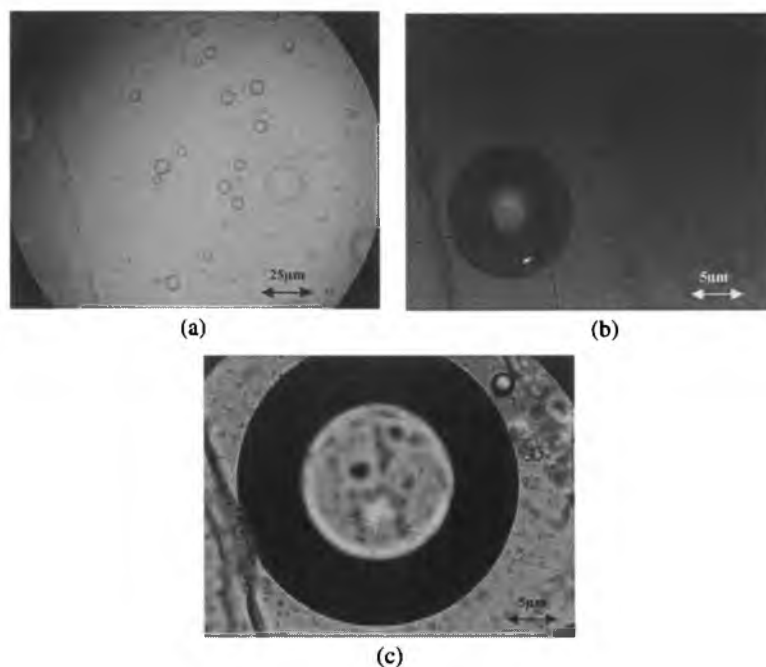


Figure 2. Patterns recorded in the upper layer of the ibuprofen solution: (a) multiple concentric patterns; (b) single concentric pattern with pure water constituting the “white pupil”; (c) single concentric pattern with smaller microemulsion droplets visible in the “white pupil”.

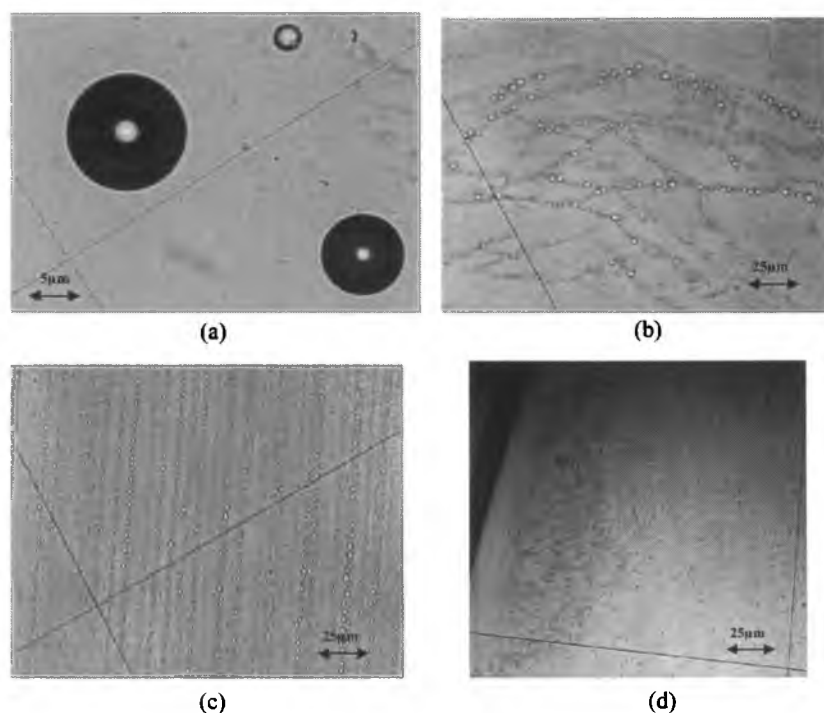


Figure 3. Patterns recorded in the upper and lower layers of ketoprofen solutions: (a) concentric patterns visible in the lower layer; (b) small white dots on a curved stripe in the upper layer; (c) small white dots on a straight stripe from the same layer; and (d) spiral pattern from the same layer.

spatial patterns than the layer with the higher concentration, but these differences were mainly quantitative.

Figure 4 contains two snapshots taken 10 s apart in the upper ibuprofen layer showing an antispiral wave, i.e., a spiral wave that moves in toward its core,^[11] encapsulated in a larger droplet of microemulsion. The motion of the spatial patterns appears to result from chemical and diffusive processes rather than convection. The same behavior was observed in experiments using a water filter (a water layer ca. 0.5 cm thick in a plastic cell and placed under the sandwiched sample of the profen solution) to absorb any infrared radiation from the microscope lamp, thereby eliminating heating of the solution from below. The sandwich configuration prevents evaporative cooling of the solution from above, and the solutions are quite viscous. The typical speed of the patterns was ca. 0.25 cm min^{-1} .

We attempted to assess the chemical composition of the circular target patterns like those shown in Figs 2b and 3a. We used Raman

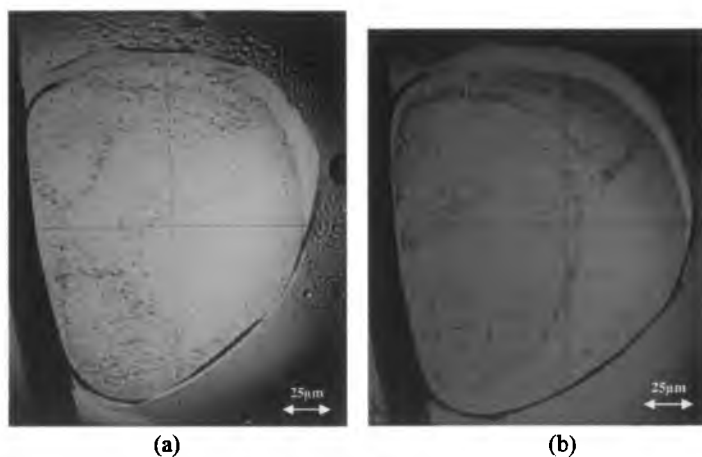


Figure 4. An inwardly rotating antispiral wave encapsulated in a microemulsion drop from the upper layer of ibuprofen solution after (a) 0 s, and (b) 10 s.

spectroscopy to measure the chemical composition in the white inner circle, outside the concentric annulus, and also in the dark rim between these two moieties in Fig. 2b. The spectra obtained are shown in Fig. 5. The outside of the dark rim gave a well-shaped Raman spectrum composed of superposed signals originating from ethanol and ibuprofen.

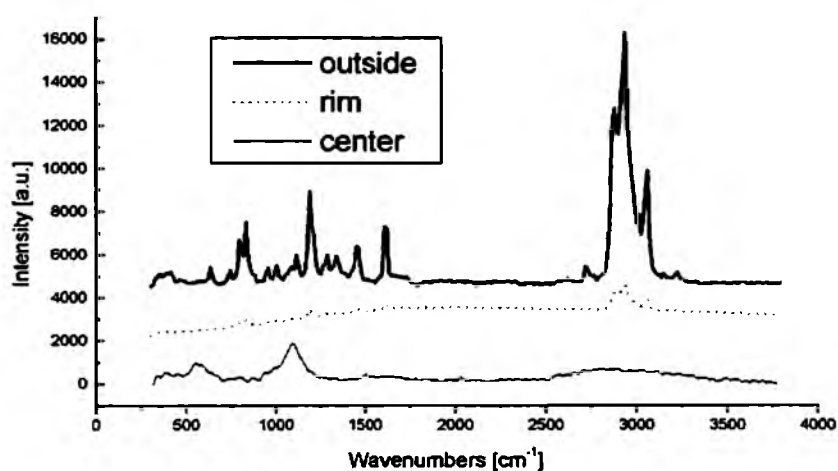


Figure 5. Raman spectra collected from the center (“white pupil”) of the concentric pattern shown in Fig. 2b, the dark rim of the pattern, and outside the pattern.

The contribution of ibuprofen to this spectrum is best documented by the presence of stretching vibrations of the carboxylic C=O group ($\nu_{\text{C=O}} \cong 1625 \text{ cm}^{-1}$) and the stretching vibrations of the aromatic C-H bonds ($\nu_{\text{C-H}} \cong 3100 \text{ cm}^{-1}$). The spectrum measured from the dark rim also revealed the presence of ethanol and ibuprofen although at much lower concentrations. The spectrum run from the white inner circle showed low Raman intensity, which suggests that, in the target center, one encounters either pure water (a very poor Raman scatterer), or a void. The void (possibly an air bubble captured in the sticky medium) seems unlikely in view of the many other targets with traces of ethanol and ibuprofen inside the "white pupil" as well (e.g., the target shown in Fig. 2c).

The combined TLC, Raman spectroscopic, and microscopic results suggest that, in the course of the spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion, partial demixing of the ethanol-water binary solvent takes place, probably due to the density anisotropy caused by the gelation of the profens, which affects the molecular diffusion. As a result, a micro-emulsion is formed and the "ripest" emulsion droplets (like that shown in Fig. 2b) containing only water in the inner circle, while profen is dissolved in the more concentrated aqueous-ethanol solution outside the target.

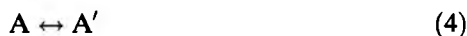
Modeling

Our efforts to model this complex behavior are based on a simple model^[5,6] introduced to describe oscillations in a self-replicating dimerization reaction. The core of this templator model consists of three reactions: inflow of monomer A (reaction 1) at rate $k_0 a_0$, where k_0 and a_0 represent the inflow rate and reservoir concentration, respectively; dimerization of A to form B, with another B molecule serving as a template (reaction 2) at rate $k_d a^2 b$; and removal of B at a surface (reaction 3) at rate $k_2 B/(B+K)$. Species are represented by capital letters, and their concentrations by small letters.



In our system, A represents one antimer, say S-(+)-ibuprofen, and B represents its dimer, and we introduce a parallel set of reactions for the other antimer and its dimer, denoting those species as A' and B', respectively. We also introduce the enol-mediated enantiomerization

reaction (4) with first order rate constant k_e .



Here, Eq. (1) might represent transfer of monomers across the interface between the layers, and Eq. (3) might describe adsorption of dimers at either the interface or the glass surface. The model is clearly oversimplified and omits, for example, the possibility of mixed dimers, AA' , as well as many other aspects of the system. We can hope, at best, for some qualitative insight into the observed behavior.

If we introduce diffusion and assume that monomers diffuse more rapidly than dimers, we can derive a set of partial differential equations from Eqs. (1)–(4) and the counterparts of Eqs. (1)–(3) for the reactions of A' and B' . These equations characterize the behavior of A , B , A' , and B' in one layer of our model system. The fact that A and A' , B , and B' are enantiomers requires that all primed rate constants be identical to their unprimed counterparts. However, a_0 and a'_0 may differ, because the two layers have different enantiomeric compositions. The resulting equations are

$$\frac{\partial a}{\partial t} = k_0 a_0 - 2k_d a^2 b - k_e(a - a') + D\nabla^2 a \quad (5)$$

$$\frac{\partial b}{\partial t} = a^2 b + \frac{k_2 b}{b + K} + d\nabla^2 b \quad (6)$$

$$\frac{\partial a'}{\partial t} = k_0 a'_0 - 2k_d a'^2 b' - k_e(a' - a) + D\nabla^2 a' \quad (7)$$

$$\frac{\partial b'}{\partial t} = k_d a'^2 b' + \frac{k_2 b'}{b' + K} + d\nabla^2 b' \quad (8)$$

where

$$\nabla^2 a = \frac{\partial^2 a}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 a}{\partial y^2}$$

We choose zero flux boundary conditions and impose a small random fluctuation in A with the initial uniform concentrations of all variables given by $a(0) = 2$, $b(0) = 0.1$, $a'(0) = 0.01$, $b'(0) = 0.01$. Numerically integrating the equations with the parameters $k_0 a_0 = 1$, $k_0 a'_0 = 0.2$, $k_d = 1$, $k_2 = 1$, $K = 0.1$, $k_e = 0.1$, $d = 0.1$, $D = 1$, on a grid of size $L_x = L_y = 60$ yields the results shown in Figure 6. All lengths, times, and concentrations have been made dimensionless by appropriate normalization of the parameters.

A linear stability analysis of Eqs. (5)–(8) shows that, for the chosen ratio of diffusion constants $d/D = 0.1$, homogeneous oscillation is the stable state of the system, but if the initial perturbation is sufficiently

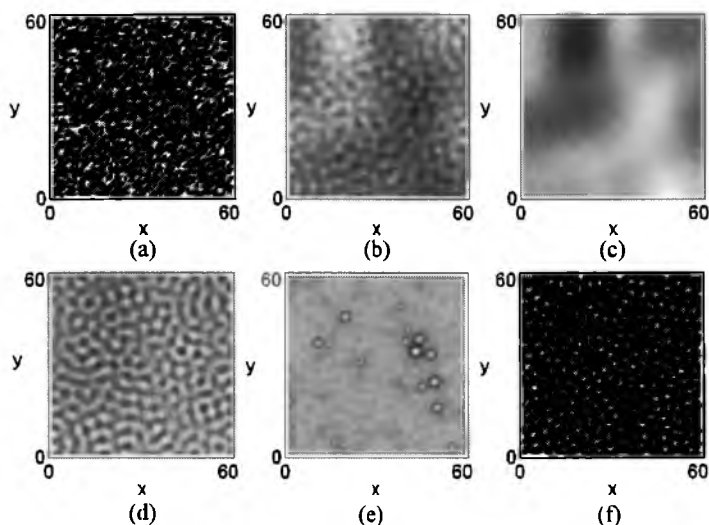


Figure 6. Spatial distribution of enantiomeric excess, $e.e. = (a + 2a' - b - 2b') / (a + 2a' + b + 2b')$, for $t = 0$ (a), 17.5 (b), 24.5 (c), 46 (d), 64 (e) and 100 (f). White corresponds to $e.e. = -1$, and black to 1, respectively.

large, as in Fig. 6a, a long spatially inhomogeneous transient arises (Fig. 6b–f), which shows a remarkable resemblance to some of the patterns seen in our experiments. While our model clearly has many limitations and is only a caricature of the actual system, the appearance of such complex patterns in even this simple model may provide some insight into the origin of the surprising behavior observed in profen solutions.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Merck KGaA (Darmstadt, Germany) for supplying the TLC plates used in our experiments. I.R.E. and M.L. were supported by U.S. National Science Foundation grant CHE-0615507.

REFERENCES

1. Sajewicz, M.; Piętko, R.; Pieniak, A.; Kowalska, T. Application of thin-layer chromatography (TLC) to investigating oscillatory instability of the selected profen enantiomers. *Acta Chromatogr.* **2005**, *15*, 131–149.
2. Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Wróbel, M.; Kowalska, T. Enantioseparation and oscillatory transesterification of S,R-(±)-ketoprofen, as investigated

- by means of thin layer chromatography with densitometric detection. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **2007** *30*, 2193–2208.
3. Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Kronenbach, D.; Wojtal, Ł.; Grygierczyk, G.; Kowalska, T. A study on the oscillatory in vitro transenantiomerization and enantioseparation of the flurbiprofen antimers by means of thin layer chromatography (TLC). *Acta Chromatogr.* **2007**, *18*, 227–238.
 4. Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Wojtal, Ł.; Kronenbach, D.; Leda, M.; Epstein, I.R.; Kowalska, T. Experimental and Model Investigation of the Oscillatory Transenantiomerization of *L*- α -Phenylalanine. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **2008**, *31*, 1986–2005.
 5. Peacock-Lopez, E.; Radov, D.B.; Flesner, C.S. Mixed-mode oscillations in a self-replicating dimerization mechanism. *Biophys. Chem.* **1997**, *65*, 171–178.
 6. Tsai, L.L.; Hutchinson, G.R.; Peacock-Lopez, E. Turing patterns in a self-replicating mechanism with a self-complementary template. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 2003–2006.
 7. Bhushan, R.; Martens, J. Chiral Separation of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, in: *Thin Layer Chromatography in Chiral Separations and Analysis* Kowalska, T., Sherma, J., Eds.; CRC Press/Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, 2007, 337–340.
 8. Franks, F. *Water*; Cambridge University Press: Cambridge, 1984, Chapter 7.
 9. Xie, Y.; Liu, H.; Chen, J. Kinetics of base catalyzed racemization of ibuprofen enantiomers. *Intl. J. Pharm.* **2000**, *196*, 21–26.
 10. Sajewicz, M.; Piętko, R.; Kuś, P.; Kowalska, T. On the gelation of profens as a property causing their oscillatory transenantiomerization. *Acta Chromatogr.* **2006**, *16*, 181–191.
 11. Vanag, V.K.; Epstein, I.R. Inwardly Rotating Spiral Waves in a Reaction-Diffusion System. *Science*. **2001**, *294*, 835–837.
 12. Yang, L.; Dolnik, M.; Zhabotinsky, A.M.; Epstein, I.R. Spatial Resonances and Superposition Patterns in a Reaction-Diffusion Model with Interacting Turing Modes. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 208303-1-4.

Received September 22, 2008

Accepted October 20, 2008

Manuscript 6469F

TLC in a Search for Structural Limitations of Spontaneous Oscillatory In-Vitro Chiral Conversion. α -Hydroxybutyric and Mandelic Acids

Mieczysław Sajewicz, Dorota Kronenbach, Monika Gontarska, Magdalena Wróbel, Robert Piętka, and Teresa Kowalska*

Key Words

Oscillatory chiral conversion
Enantiomer separation
TLC
Polarimetry
 α -Hydroxybutyric acid
Mandelic acid

Summary

As a result of our earlier studies, we were the first research group to report the spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion of a considerable number of α -substituted propionic acids (i.e., selected profens, amino acids, and L-lactic acid). It is noteworthy that TLC proved highly instrumental in collecting relevant confirmatory evidence on this issue. Besides, in two papers we introduced a theoretical model and with its aid, we could simulate basic physical and physicochemical features of the discussed process. Reflecting on the oscillatory chiral conversion, we realized that it seems to be a rather general phenomenon and we started contemplating its scope and limitations. It became our primary concern to check whether it is confined to α -substituted propionic acids only or can occur with other classes of chiral compounds also. To this effect, in this study we present empirical (thin-layer chromatographic and polarimetric) evidence on an ability of *R* and *S*- α -hydroxybutyric acids, and *R* and *S*-mandelic acids to undergo spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion when dissolved in 70% aqueous ethanol. From the obtained results, general conclusion can be drawn that the process of interest occurs not only with chiral carboxylic acids having three carbon atoms per molecule, but also with those having two and four carbon atoms.

1 Introduction

The chiral instability of many compounds is well established and well documented, especially with compounds of pharmacological, biological, or related importance and it often results in chiral conversion (in our earliest papers referred to as transesterification) (for example Refs 1–3). As a matter of fact, incomparably more attention has been paid by the scientific community (and for obvious safety reasons) to chiral conver-

sion of drugs (generally, taking place in vivo), than to any other chiral instability and conversion-related problem.

Chiral conversion is not an easy phenomenon to monitor, because enantiomer separation remains among the most challenging separation tasks. For the time being, chromatographic techniques – despite their often imperfect performance – seem the best suited for the task of enantiomer separation and, hence, for monitoring the phenomenon of chiral conversion. In 2005, an interesting and helpful review paper was published by Wolf [4], summarizing experimental evidence from analysis of stereolabile chiral compounds by dynamic chromatography and stopped-flow methods. In 2008, Wolf published a book which focuses on the same issue and discusses it in a much greater detail [5].

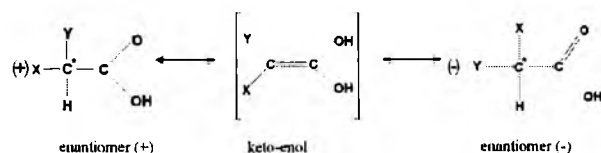
Original research papers reviewed elsewhere [4, 5], basically referred to simple (i.e., irreversible) chiral conversion, as monitored by instrumental analytical techniques. In 2005, the first paper was published by our research group [6] that referred to spontaneous oscillatory chiral conversion of profens, as monitored by TLC. In that pioneering paper we for the first time demonstrated high potential of TLC for study of spontaneous oscillatory (and not unidirectional only) chiral conversion of selected drugs. Moreover, it was the first report on chiral conversion of profens occurring in vitro. Since that first publication, further reports have been published by our group on similar effects recorded by TLC and referring to selected amino acids (for example Refs 7 and 8) and L-lactic acid (for example Ref. 9).

In other papers [10, 11] a theoretical explanation was given of the spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion of α -substituted propionic acids. Our approach was based on an earlier Templator model of an oscillator [12, 13], and because of the coupled effect of the oscillatory chiral conversion with a pair of antimers from our studies, it was named the model of two linked Templators.

With time, the list of chemical compounds undergoing confirmed spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion expanded and it became a matter of our concern to reflect on the

M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, M. Wróbel, R. Piętka, and T. Kowalska, Institute of Chemistry, Silesian University, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland.
E-mail: kowalska@us.edu.pl

scope and structural limitations with the compounds able to undergo this process, and also on the ways and means to successfully hamper it. In general terms, the oscillatory chiral conversion can be summarized by the equation [6–11, 14]:



where X and Y are two different substituents of the α -carbon atom coupled to the carboxyl group.

In Ref. 15 we presented the results of our study on hampering the spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion of L-lactic acid dissolved in water in the presence of the copper(II) cation. In the system investigated, L-lactic acid molecules acted as chiral ligands chelating the metal cation through coordinate covalent bonds and the chiral stability of this system was checked by polarimetry, circular dichroic spectroscopy (CD), and TLC.

As all previous cases of the documented oscillatory chiral conversion were observed with α -substituted propionic acids only, we started contemplating the structural scope and limitations of the compounds able to undergo this process. In this study, we investigate two α -substituted butyric acids (*R* and *S*- α -hydroxybutyric acid), and two α -substituted acetic acids (*R* and *S*-mandelic acid) for their ability to undergo the spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion in ethanol–water 7:3 (v/v). The results obtained by TLC and polarimetry are presented and discussed in this paper.

2 Experimental

2.1 Chiral Analytes

2.1.1 α -Hydroxybutyric Acids

The structural formulas of *S* and *R*- α -hydroxybutyric acid are given in Figure 1. In our study, we used samples of *S* and *R*- α -

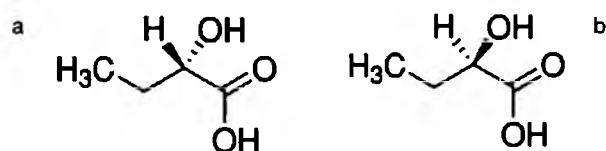


Figure 1

The chemical structures of (a) *S*- α -hydroxybutyric acid and (b) *R*- α -hydroxybutyric acid.

hydroxybutyric acid manufactured by Fluka (Buchs, Switzerland; #54918 and 54917, respectively).

For the 1D TLC we used solutions of the α -hydroxybutyric acid enantiomers in ethanol–water 7:3 (v/v); their respective concentrations were 50 g L⁻¹ (4.80×10^{-1} mol L⁻¹). For 2D development and polarimetry, we used solutions in the same binary solvent mixture; their respective concentrations were 150 g L⁻¹ (1.44 mol L⁻¹). For 2D development we also used the racemic mixture *S,R*-(\pm)-hydroxybutyric acid dissolved in ethanol–water

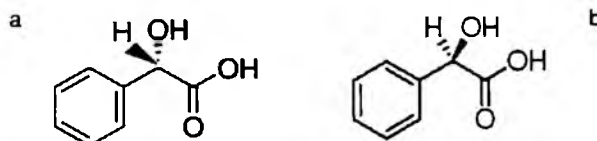


Figure 2

The chemical structures of (a) *S*-(+)-mandelic acid and (b) *R*-(−)-mandelic acid.

7:3 (v/v) in which the concentrations of the two antimers were each 75 g L⁻¹ (0.72 mol L⁻¹).

Methanol and dioxane used in our experiments were of HPLC purity grade (Merck, Darmstadt, Germany), ethanol was of analytical purity grade (POCh, Gliwice, Poland), and water was double-distilled and de-ionized in our laboratory.

2.1.2 Mandelic Acids

The structural formulas of *S*-(+) and *R*-(−)-mandelic acid are given in Figure 2. In our study, we used samples of *S*-(+) and *R*-(−)-mandelic acid manufactured by Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA; #M2004 and 154210, respectively).

For 1D thin-layer chromatography we used solutions of the mandelic acid enantiomers in ethanol–water 7:3 (v/v); their respective concentrations were 42.5 g L⁻¹ (2.79×10^{-1} mol L⁻¹). For 2D development and polarimetry we used solutions in the same solvent mixture; their respective concentrations were 85 g L⁻¹ (5.59 mol L⁻¹). For 2D development we also used the racemic mixture *S,R*-(\pm)-mandelic acid dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v) in which the concentrations of the two antimers were 42.5 g L⁻¹ (2.80 mol L⁻¹) each.

2.2 Thin-Layer Chromatography (TLC)

Development of the chromatograms was carried out on commercial chromatographic glass plates precoated with 0.25 mm thick silica gel layers (20 cm \times 20 cm; manufactured by Merck; #1.05715). Before development, all plates were predeveloped in methanol–water 9:1 (v/v), to wash out any possible impurities adsorbed on the solid silica gel layer during plate storage, then dried at ambient temperature for 3 h. Then the plates were impregnated by dipping them for 2 s in a 5.01×10^{-2} mol L⁻¹ aqueous solution of Cu(CH₃COO)₂ (analytical purity grade, manufactured by POCh).

2.2.1 α -Hydroxybutyric Acids

Thin-layer chromatographic development of α -hydroxybutyric acids was performed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. For both 1D and 2D chromatography dioxane–water 9:1 (v/v) was used as mobile phase.

The antimer samples of α -hydroxybutyric acids were applied to the chromatographic plates by use of a Desaga (Heidelberg, Germany) AS 30 automatic applicator. For 1D development, 3- μL volumes of the samples were applied 1 cm above the lower edge of the plate, eight samples per plate, 2 cm apart (the first four bands were of the *S* antimer followed by four bands of the *R* antimer). The development distance was 8.5 cm and the plates were then dried for 3 h at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Finally, each lane was densitometrically scanned in the direction of development. This experiment was performed for 16 days and the chromatograms of the gradually ageing α -hydroxybutyric acid solutions were

developed at one-day intervals. High-performance liquid chromatographic (HPLC) evidence was obtained to prove that no structural degradation or condensation of the α -hydroxybutyric acids antimers occurred during the course of the storage period.

Densitograms were acquired by use of a (Desaga) CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant data-acquisition and processing software. For scanning, the wavelength 326 nm was selected from the mercury lamp and the geometry of the scanning beam was 0.1 mm \times 1.0 mm. The R_f values of the analytes in 1D development were calculated from their respective concentration profiles.

For 2D development one sample (3 μ L) of the α -hydroxybutyric acid solution was applied at the bottom corner of the plate and the plate was then developed in the first direction to a distance of 8.5 cm. Solutions of *S*-(+), *R*-(-), and *S,R*-(\pm)- α -hydroxybutyric acid were developed, each on a separate plate. The plates were then dried for 3 h at 22 \pm 2°C and developed again in the second dimension, perpendicular to the first, to a distance of 8.5 cm. The plates were ultimately dried for 3 h at 22 \pm 2°C and densitometrically scanned in the direction of the second development by use of 30 parallel scans 1 mm from each other. Scanning conditions were the same as described for 1D development. UV spectra of the separated α -hydroxybutyric acid antimers were acquired in situ, for this purpose using the deuterium lamp. Each 1D and 2D thin-layer chromatographic experiment was repeated three times.

2.2.2 Mandelic Acid

The experiment with mandelic acid was analogous to that performed with α -hydroxybutyric acid in this sense that the samples of mandelic acid antimers were applied on to the chromatographic plates by use of an automatic applicator, and the chromatograms were developed in 1D and 2D modes, as described in Section 2.2.1. The qualitative and quantitative composition of the mobile phases were also identical, as were the methods used for scanning the 1D and 2D chromatograms. Again HPLC evidence was obtained to prove that no structural degradation or condensation of the mandelic acid antimers occurred during storage.

For 1D development of mandelic acid, 1.5- μ L volumes were applied to the adsorbent surface 1 cm above the lower edge of the plate, 2 cm from each other (the first four bands were of the *S* antimer, followed by four bands of the *R* antimer). This experiment was performed for 12 days and chromatograms of the gradually ageing mandelic acid samples were developed at one-day intervals.

For 2D development one sample of mandelic acid solution (3- μ L) was applied to the bottom corner of the plate and the developing and scanning procedures were analogous with those described for α -hydroxybutyric acid.

Concentration profiles of the mandelic acid samples chromatographed by 1D development were scanned with UV light at 305 nm from the mercury lamp; the beam geometry was 0.1 mm \times 3.0 mm. Scanning of the chromatograms obtained from 2D development was performed at the same wavelength but this time the beam geometry was 0.1 mm \times 1.0 mm. UV spectra of the mandelic acid antimers separated by 2D development were acquired in situ by use of the deuterium lamp. Again, all 1D and 2D thin-layer chromatographic experiments were repeated three times.

2.3 Polarimetry

Measurements of the specific rotation ($[\alpha]_D$) of all the samples were performed by use of a Polamat A model polarimeter (Carl Zeiss, Jena, Germany). The cell length and volume were 1 dm and 1 mL, respectively. The specific rotation of the samples was calculated by use of the equation:

$$[\alpha]_D = 100\alpha/cd \quad (2)$$

where α is the measured rotation angle (in angle degrees), D is the wavelength (589 nm), c denotes the concentration of the investigated compound in g 100 mL⁻¹ solution, and d is the optical pathlength in dm.

2.3.1 α -Hydroxybutyric Acid

Polarimetric measurements of specific rotation ($[\alpha]_D$) for each α -hydroxybutyric acid antimer were performed in two separate experiments. In experiment 1, solutions of α -hydroxybutyric acid in ethanol–water 7:3 (v/v) were stored at 22 \pm 2°C for 9 days (*S* enantiomer) or for 13 days (*R* enantiomer) and measurements were made for several hours a day at 15-min intervals.

In experiment 2, the specific rotation ($[\alpha]_D$) of two series of the freshly prepared α -hydroxybutyric acid solutions in ethanol–water 7:3 (v/v) was measured at 15-min intervals for 6 h, separately at 22 \pm 2°C and 9 \pm 2°C.

A literature survey [16–19] revealed striking variety in the specific rotation ($[\alpha]_D$) values reported by different authors. For the *S* antimer the $[\alpha]_D$ values were in the range –6.8 to 2.3° in water and from –4.4° to –3.8° in ethanol. For the *R* antimer, reported $[\alpha]_D$ values were in the range 2.5° to 6.0°. It is noteworthy that all the reference data were for the temperature 22°C (or approx.).

2.3.2 Mandelic Acid

By analogy with α -hydroxybutyric acid, polarimetric measurements of specific rotation ($[\alpha]_D$) for each mandelic acid antimer were performed in two separate experiments. In experiment 1, solutions of mandelic acid in ethanol–water 7:3 (v/v) were stored at 22 \pm 2°C for 32 days (*S* enantiomer) or for 26 days (*R* enantiomer), and measurements were made for periods of several hours per day at 15-min intervals.

In experiment 2, the specific rotation ($[\alpha]_D$) of two series of the freshly prepared mandelic acid solutions in ethanol–water 7:3 (v/v) was measured at 15-min intervals for 6 h, separately at 22 \pm 2°C and 9 \pm 2°C.

As reported elsewhere [16, 20, 21], $[\alpha]_D$ for the *S* antimer is 156° in water and 151.5° in ethanol. The $[\alpha]_D$ value for *R*-(–)-mandelic acid is –154.2° in water [20], –153.5 in ethanol [21], and –155.0° in 95% in aqueous ethanol [22] (these results are for solutions kept at ambient temperature).

3 Results and Discussion

3.1 Thin-Layer Chromatography (TLC)

After a thorough survey of the available literature, as far as we are aware the results presented in this section are the first attempts at separation of the enantiomers of α -hydroxybutyric

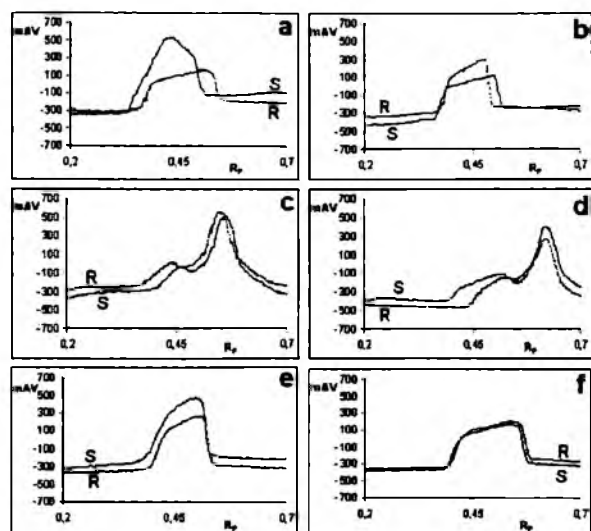


Figure 3

Sequence of densitometric concentration profiles (snapshots) for *S* and *R*- α -hydroxybutyric acid solutions in ethanol–water 7:3 (v/v) after storage at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for (a) 0 days, (b) 2 days, (c) 6 days, (d) 9 days, (e) 13 days, and (f) 15 days.

acid and mandelic acid by TLC (although enantiomer separation alone was not an ultimate objective of this study).

3.1.1 α -Hydroxybutyric Acid

The ultimate objective of separation of *S* and *R*- α -hydroxybutyric acid was to check whether these two optically pure enantiomers can undergo spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion when dissolved in 7:3 (v/v) ethanol–water. To this effect, the stored *S* and *R*- α -hydroxybutyric acid solutions were chromatographed in 1D mode at one-day intervals and the chromatograms obtained were scanned densitometrically.

Empirical evidence of the oscillatory chiral conversion with α -hydroxybutyric acid antimers is demonstrated in Figure 3, which shows selected snapshots of the concentration profiles of the *S* and *R* antimers on the first day of the experiment and after 2, 6, 9, 13, and 15 days of storage at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. These snapshots show that the concentration profiles of the investigated compounds steadily change their shape and position on the scale of R_F values, which is the best proof of their chiral lability and of the oscillatory chiral conversion running all the time. Even on the first day of the experiment, the concentration profiles of the two antimers partially overlap, yet they are broad enough to suggest rapid chiral conversion and the presence of the two antimers under the peak envelope. Luckily enough, on the first day (and also on day 2), the maxima of these two bands do not overlap and, hence, it can be assumed that the *R* antimer migrates higher than the *S* antimer (their respective R_F values on the first day of the experiment are 0.52 and 0.44). On days 13 and 15, the concentration profiles of the two antimers almost fully overlap and on days 6 and 9, partial separation of the enantiomers is achieved with the two samples. The close position of the bands belonging to the two antimers is because of so-called lateral interactions, i.e. intermolecular *S*...*R* interactions through hydrogen bonds, which make separation of the enantiomers of carboxylic acids a challenging task.

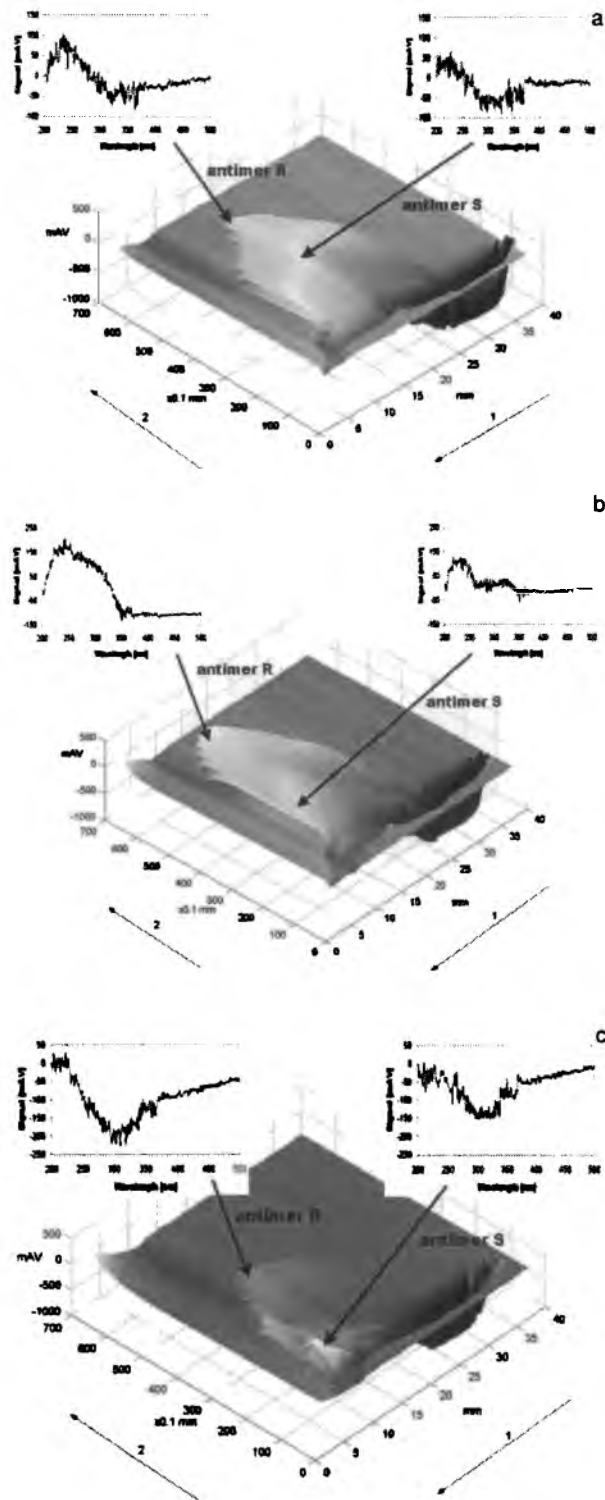


Figure 4

Three-dimensional representation of the chromatograms of α -hydroxybutyric acid after 2D development of (a) *S*- α -hydroxybutyric acid solution stored for 16 days, (b) *R*- α -hydroxybutyric acid solution stored for 16 days, and (c) *S,R*- α -hydroxybutyric acid solution stored for 5 days. All solutions were in ethanol–water 7:3 (v/v) and stored at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. The 3D pictures were based on densitometric scans of the separated pairs of α -hydroxybutyric acid antimers taken at 1-mm intervals.

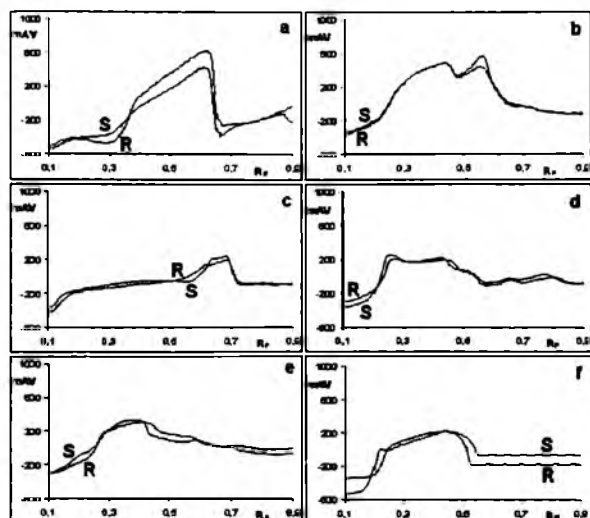


Figure 5

Sequence of densitometric concentration profiles (snapshots) for *S*-(+)- and *R*-(-)-mandelic acid solutions in ethanol–water 7:3 (v/v) after storage at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for (a) 0 days, (b) 2 days, (c) 4 days, (d) 7 days, (e) 9 days, and (f) 11 days.

It is virtually impossible to conclude from chromatographic evidence alone when the oscillatory chiral conversion really starts – whether it commences immediately after dissolution of the acid sample in ethanol–water or is triggered by intermolecular interactions of acid molecules with silica gel present in the TLC system or is influenced by each of these factors.

Encouraged by an occasional partial separation of the enantiomers of the α -hydroxybutyric acid antimers by 1D development (as shown in Figures 3c and 3d), we decided to try 2D development also. To this effect, we chromatographed samples of *S*- α -hydroxybutyric acid and *R*- α -hydroxybutyric acid solutions (each stored for 16 days), and a sample of *S,R*- α -hydroxybutyric acid (stored for five days). The 3D densitograms obtained from the successful enantiomer separations, with the respective UV spectra acquired in situ from the maximum of each separated enantiomer, are shown in Figure 4. In each of these 3D chromatograms the band intensity of the UV spectrum attributed to the *R* enantiomer was higher than that attributed to the *S* enantiomer, which suggested a relatively greater amount of the *R* enantiomer than the *S* enantiomer in each sample and, indirectly, slower chiral conversion of the *R* enantiomer (this observation was confirmed by the results from polarimetry, discussed in Section 3.2.1).

3.1.2 Mandelic Acid

In this work also, similar to the enantiomer separation experiment with *S* and *R*- α -hydroxybutyric acid, the ultimate objective was to check whether *S*-(+)- and *R*-(-)-mandelic acid undergo spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion when dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v). To this effect, stored mandelic acid samples were chromatographed at one-day intervals by 1D development and the chromatograms obtained were scanned densitometrically.

Empirical evidence of the oscillatory chiral conversion of mandelic acid antimers is illustrated in Figure 5, which shows

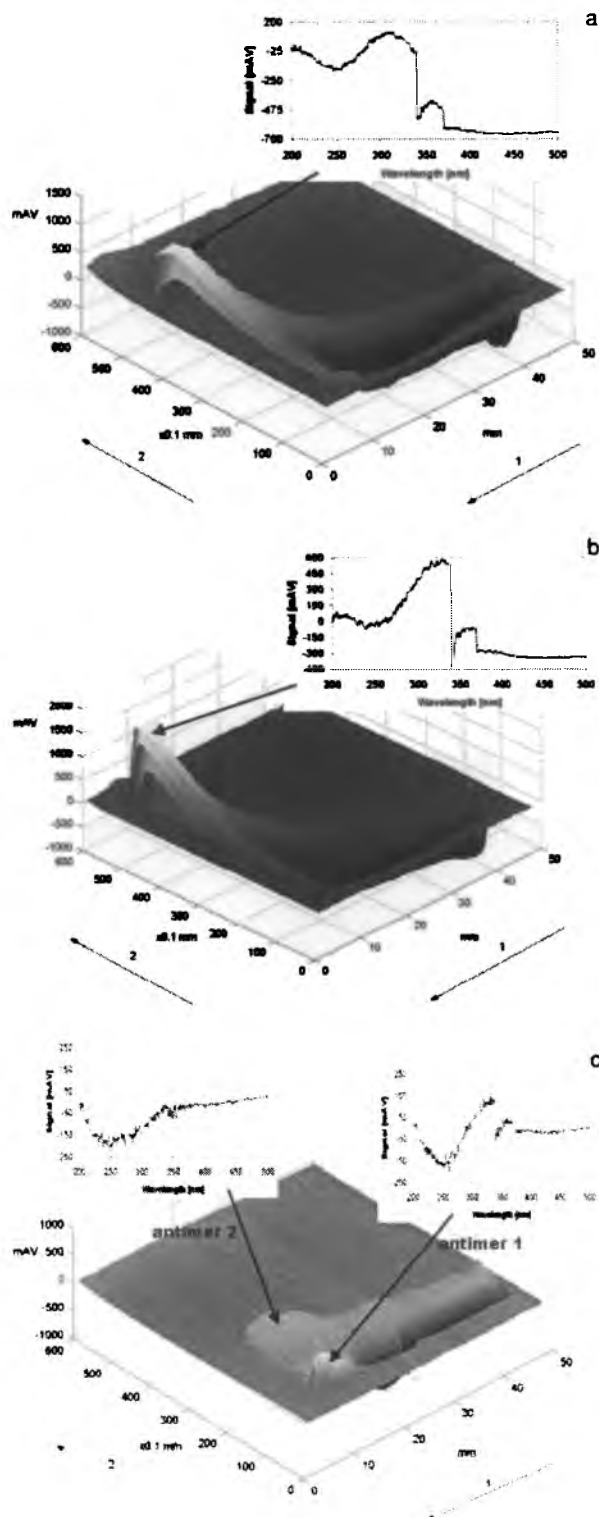


Figure 6

Three-dimensional representation of the chromatograms of mandelic acid after 2D development of the a) *S*-(+)-mandelic acid solution stored for 12 days, (b) *R*-(-)-mandelic acid solution stored for 12 days, and (c) *S,R*-(±)-mandelic acid solution stored for 2 days. All solutions were in ethanol–water 7:3 (v/v) and stored at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. The 3D pictures were based on densitometric scans taken at 1-mm intervals.

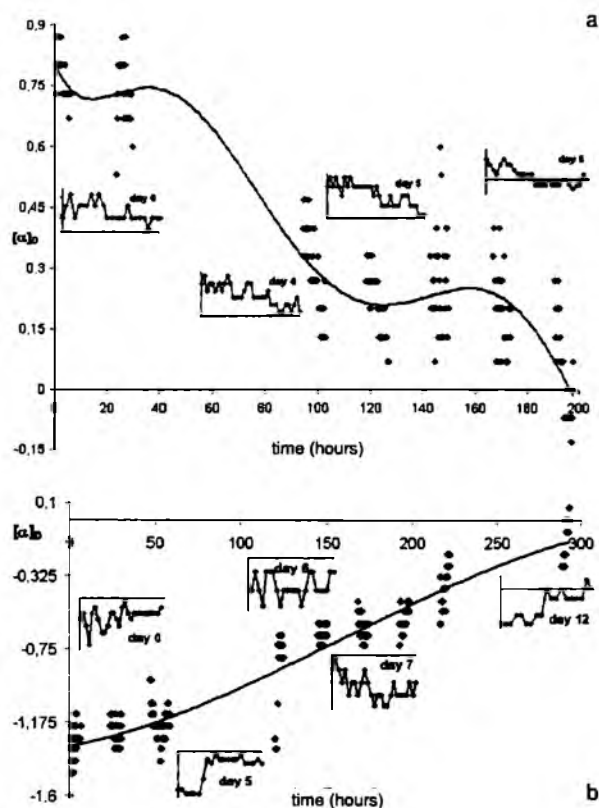


Figure 7

Oscillatory changes of specific rotation, $[\alpha]_D$, as a function of sample storage time for (a) *S*- α -hydroxybutyric acid and (b) *R*- α -hydroxybutyric acid dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v) and kept at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Windows illustrate oscillatory changes on selected measurement days and the solid line illustrates the general oscillatory trend over the entire storage period.

selected snapshots of the concentration profiles of the *S* and *R* antimers on the first day of the experiment and after storage for 2, 4, 7, 9, and 11 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Similar to the previous case, these snapshots for mandelic acid show concentration profiles of the compounds steadily changing their shape and position on the scale of R_f values; this is proof of chiral lability of the compounds and of the permanently running oscillatory chiral conversion. Unlike in the previous case, even on the first day of the experiment, concentration profiles of the two mandelic acid antimers were almost identical, which shows the oscillation period is even shorter for these two compounds (resulting in very rapid racemization) than for the α -hydroxybutyric acids. Again, these concentration profiles are broad enough to suggest the presence of the two antimers under the band and to demonstrate the negative impact of lateral interactions on the separation of the enantiomers of carboxylic acids. Even, if 1D development of the mandelic acid samples occasionally resulted in partial enantiomer separation (as shown, e.g., in Figures 5b and 5d) it was not possible to ascribe the plus and the minus signs to the two resolved maxima.

Again, it is virtually impossible to conclude from chromatographic evidence alone when the oscillatory chiral conversion of the investigated *S*-(+) and *R*-(-)-mandelic acids starts, and whether it occurs because of dissolution of the acid samples in

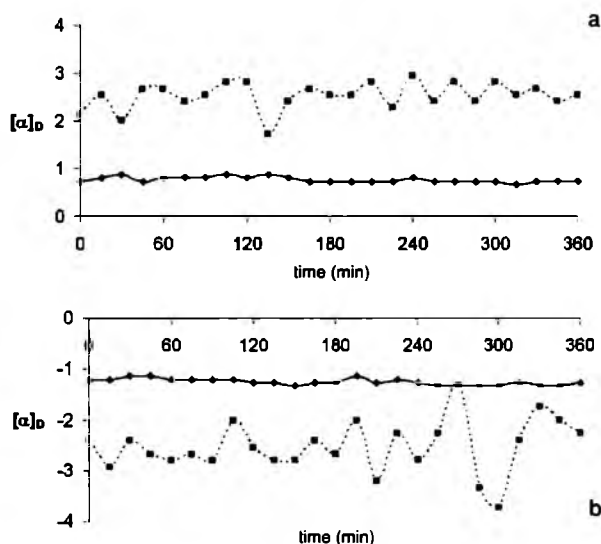


Figure 8

Comparison of the oscillations of the specific rotation, $[\alpha]_D$, of *S*- α -hydroxybutyric acid and (b) *R*- α -hydroxybutyric acid dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v) and stored for 360 min at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (solid line) and $9 \pm 2^\circ\text{C}$ (dashed line).

ethanol–water, intermolecular interactions of acid molecules with the components of the TLC system, or to a combination of these two factors.

Encouraged by the occasional partial separation of the enantiomers of mandelic acid by 1D development (Figures 5b and 5d), we also used 2D development. To this effect we chromatographed samples of *S*-(+) and *R*-(-)-mandelic acid solutions (each stored for 12 days) and a sample of *S,R*-(±)-mandelic acid solution (stored for 2 days). The results obtained, in the form of 3D chromatograms (with the in situ recorded UV spectra) are given in Figure 6. The chromatograms shown in Figures 6a and 6b illustrate the lack of separation of the enantiomers of *S*-(+) and *R*-(-)-mandelic acid. Evidently, chiral conversion of the mandelic acid antimers is so rapid and lateral *S*...*R* interactions so effective that – similar to 1D development – in this case also separation of the two antimers is not always possible. In Figure 6c, successful separation of the enantiomers of *S,R*-(±)-mandelic acid is shown. In this case – similar to separation of the enantiomers of α -hydroxybutyric acid – the fraction having the lower R_f value is more abundant, but there is no legitimate means of attributing the plus or minus sign to it.

3.2 Polarimetry

Although polarimetry is the primary analytical tool used to investigate chirality, with its aid we are unable to distinguish between the change of specific rotation, $[\alpha]_D$, because of oscillatory chiral conversion and that resulting from self-association of the molecules to form supramolecular aggregates with a dynamic composition and changing steric arrangement. Hence, the results presented in the sections below should be viewed as a possible joint effect of chiral conversion (chemical process) and formation of dynamic supramolecular aggregates (physical process). However, the long-term oscillatory changes of specific rotation recorded in this study (and resulting in $[\alpha]_D \approx 0$) are

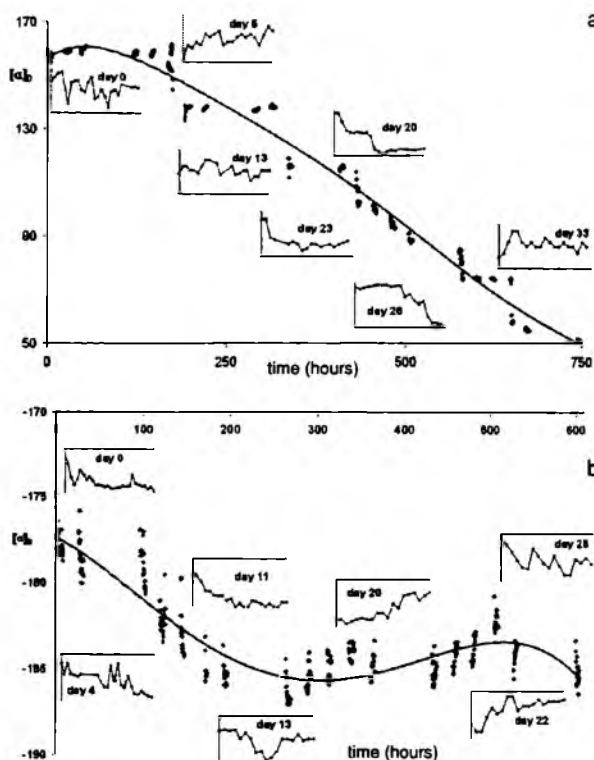


Figure 9

Oscillatory changes of the specific rotation, $[\alpha]_D$, as a function of sample storage time for (a) *S*-(+)-mandelic acid and (b) *R*-(-)-mandelic acid dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v) and kept at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Windows illustrate oscillatory changes on selected measurement days and the solid line illustrates the general oscillatory trend over the entire storage period.

unequivocally attributable to chiral conversion and, more specifically, to racemization (or scalemization) of the samples.

3.2.1 α -Hydroxybutyric Acid

Investigation of the specific rotation ($[\alpha]_D$) change for α -hydroxybutyric acid enantiomers dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v), was carried out in experiments 1 and 2 described in Section 2.3.1.

From the results of experiment 1 it was apparent that during long-term storage the numerical values of $[\alpha]_D$ for the two antimers tended to zero in an oscillatory manner (Figure 7). Thus a conclusion can be drawn that during the storage period, two α -hydroxybutyric acid antimers underwent gradual racemization. This process proved, however, more dynamic with *S* enantiomer than with its *R* antimer (Figures 7a and 7b). This difference can result from unequal trace amounts of a contaminating antimer in the α -hydroxybutyric acid samples investigated (both of analytical purity grade), as explained in the theoretical model introduced elsewhere [10].

The results of experiment 2 are given as plots in Figure 8. For each α -hydroxybutyric acid antimer, the oscillatory changes of the specific rotation value are far more pronounced at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ than at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. This is certainly because of increased (and probably anisotropic) viscosity of the solutions at the lower temperature and, as a consequence, lower molar diffusion coefficient

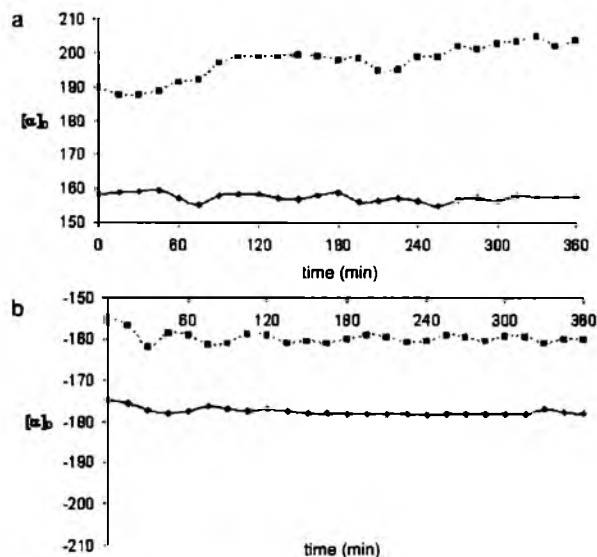


Figure 10

Comparison of the oscillations of the specific rotation, $[\alpha]_D$, of *S*-(+)-mandelic acid and (b) *R*-(-)-mandelic acid dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v) and stored for 360 min at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (solid line) and $9 \pm 2^\circ\text{C}$ (dashed line).

cients of the two α -hydroxybutyric acids in the respective solutions. It is also noteworthy that the amplitude of oscillations for the *R* enantiomer is perceptibly higher than for its *S* counterpart (Figures 8a and 8b).

3.2.2 Mandelic Acid

Investigation of the specific rotation $[\alpha]_D$ change for the enantiomers of mandelic acid dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v) was carried out in experiments 1 and 2, described in Section 2.3.2.

From the results of experiment 1 it was apparent that during long-term storage the numerical values of $[\alpha]_D$ for the two antimers were undergoing steady oscillatory change (Figure 9). These numerical values tended to zero for *S*-(+)-mandelic acid only, however (Figure 9a). For *R*-(-)-mandelic acid, during the whole period investigated, the numerical values of $[\alpha]_D$ were oscillating in the range $-180 \pm 10^\circ$. Again, this difference most probably results from a difference in the amounts of an antipode contaminating a given mandelic acid sample, as explained elsewhere [10].

The results from experiment 2 are presented in Figure 10. The oscillatory changes of the specific rotation for both mandelic acid antimers are more pronounced at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ than at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Again, this is because of increased (and probably anisotropically distributed) viscosity of the solutions at the lower temperature and, as a consequence, the reduced molar diffusion coefficient of the two α -hydroxybutyric acids. In contrast with the α -hydroxybutyric acid antimers, the oscillation amplitudes for both mandelic acid antimers are of similar intensity (Figures 8a and 8b).

4 Conclusions

The results obtained in this study lead to the following conclusions:

1. Thin-layer chromatography (combined with polarimetry as a supporting instrumental technique) is well suited to discovery and monitoring of the oscillatory chiral conversion of carboxylic acids.
2. The spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion occurs not only with α -substituted chiral carboxylic acids having three carbon atoms per molecule (i.e. those derived from propionic acid) but also with α -substituted chiral carboxylic acids having two and four carbon atoms per molecule (i.e. those derived, respectively, from acetic and butyric acids).

Acknowledgment

The work of two of the authors (D.K. and M.G.) was partially supported by PhD scholarships granted to them in 2008 within the framework of the "University as a Partner of the Economy Based on Science" (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union.

References

- [1] M.J. Thomason, W. Rhys-Williams, A.W. Lloyd, and G.W. Hanlon, *J. Appl. Microbiol.* **85** (1998) 155–163.
- [2] F. Jamali, R. Lovlin, and G. Aberg, *Chirality* **9** (1997) 29–31.
- [3] A.J. Hutt, A. Kooloobandi, and G.W. Hanlon, *Chirality* **5** (1993) 596–601.
- [4] C. Wolf, *Chem. Soc. Rev.* **34** (2005) 595–608.
- [5] C. Wolf, *Dynamic Stereochemistry of Chiral Compounds. Principles and Applications*. RSC Publishing, Cambridge, 2008.
- [6] M. Sajewicz, R. Piętko, A. Pieniak, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **15** (2005) 131–149.
- [7] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.* **21** (2008) 43–47.
- [8] M. Sajewicz, D. Kronenbach, D. Staszek, M. Wróbel, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **31** (2008) 2006–2018.
- [9] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **20** (2008) 209–225.
- [10] M. Sajewicz, M. Gontarska, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **31** (2008) 1986–2005.
- [11] M. Sajewicz, R. Wrzałik, M. Gontarska, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **32** (2009) 1359–1372.
- [12] E. Peacock-Lopez, D.B. Radov, and C.S. Flesner, *Biophys. Chem.* **65** (1997) 171–178.
- [13] L.L. Tsai, G.R. Hutchinson, and E. Peacock-Lopez, *J. Chem. Phys.* **113** (2000) 2003–2006.
- [14] Y. Xie, H. Liu, and J. Chen, *Int. J. Pharm.* **196** (2000) 21–26.
- [15] M. Sajewicz, E. John, D. Kronenbach, M. Gontarska, M. Wróbel, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **21** (2009) 39–55.
- [16] <http://www.crossfirebeilstein.com/>
- [17] P.A. Levene and H.L. Haller, *J. Biol. Chem.* **69** (1926) 165–173.
- [18] G. Just, C. Luthe, and P. Potvin, *Tetrahedron Lett.* **23** (1982) 2285–2288.
- [19] E.A. Jares-Erijman, A.I. Ingram, J.R. Carney, K.L. Rinehart, and R. Sakai, *J. Org. Chem.* **58** (1993) 4805–4808.
- [20] J. Schiffers, T. Rantanen, F. Schmidt, W. Bergmans, L. Zani, and C. Bolm, *J. Org. Chem.* **71** (2006) 2320–2331.
- [21] P.L. Polavarapu, L.P. Fontana, and H.E. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 94–99.
- [22] C.P. Whitman, J.G. Craig, and G.L. Kenyon, *Tetrahedron.* **41** (1985) 1183–1192.

Ms received: November 26, 2008

Accepted: March 3, 2009

On the Spontaneous Condensation of Selected Hydroxy Acids

M. SAJEWICZ, M. MATLENGIEWICZ, D. KRONENBACH, M. GONTARSKA AND
T. KOWALSKA

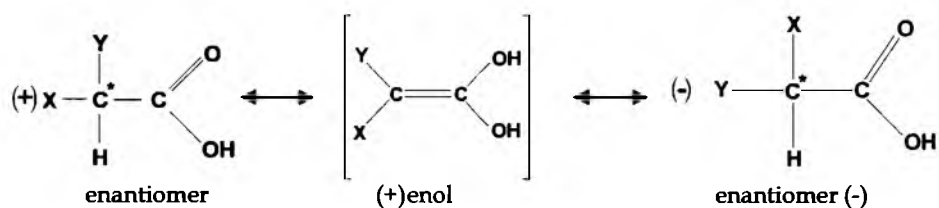
Institute of Chemistry, Silesian University, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland
E-mail: kowalska@us.edu.pl

Summary. In a previous study we provided thin-layer chromatographic, polarimetric, and other experimental evidence that phenylglycine can undergo easy spontaneous peptidization in abiotic aqueous media. From our unpublished results it is apparent that this behaviour is also characteristic of some amino acids (e.g., alanine and phenylalanine). It seems highly probable that this abiotic peptidization of amino acids dissolved in aqueous media is directly linked to their ability to undergo spontaneous oscillatory chiral conversion. In our earlier research it was also shown that spontaneous oscillatory chiral conversion was characteristic not only of amino acids but also of several other classes of carboxylic acid, including profen drugs and hydroxy acids. We therefore decided to check whether selected chiral hydroxy acids – lactic acid and mandelic acid – previously recognized for their ability to undergo spontaneous oscillatory chiral conversion, could also furnish the respective polyacids. Condensation of hydroxy acids can be viewed as a reaction fully analogous with peptidization of amino acids and, hence, it seemed to us highly probable that it also can be triggered by oscillatory chiral conversion. In our study, we used thin-layer chromatography and ^{13}C NMR spectroscopy to check whether formation of polylactic acid and polymandelic acid occurred in stored solutions of lactic and mandelic acids. By means of polarimetry with continuous recording we provided experimental evidence that all three hydroxy acids investigated (i.e. L-(+)-lactic acid, S-(+)-mandelic acid, and R-(-)-mandelic acid) undergo continuous chiral conversion. From the thin-layer chromatographic results obtained it was apparent that – similar to the spontaneous and instantaneous peptidization of amino acids – the hydroxy acids investigated also undergo easy condensation to form the respective polyacids. ^{13}C NMR spectroscopy provided additional experimental confirmation of this.

Key Words: lactic acid, polylactic acid, mandelic acid, polymandelic acid, oscillatory chiral conversion, TLC, ^{13}C NMR spectroscopy

Introduction

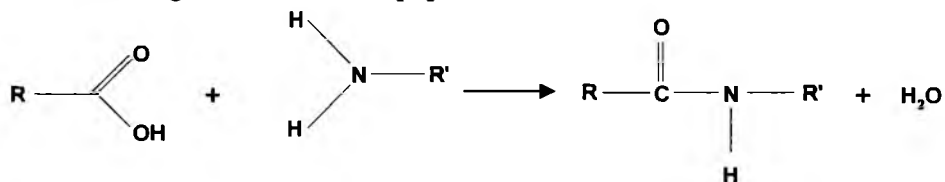
In our earlier study [1] we observed a striking example of an α -amino acid (phenylglycine) able to undergo easy and spontaneous peptidization in an abiotic aqueous medium. To us it seemed intuitively understandable that the spontaneous peptidization of phenylglycine is triggered by its ability to undergo spontaneous oscillatory chiral conversion in an abiotic liquid system, as illustrated by the scheme given below:



where X = NH₂ and Y = Ph.

We have also shown that the oscillatory chiral conversion of carboxylic acids dissolved in abiotic aqueous media is characteristic of a wide range of compound classes (e.g., profen drugs, amino acids, and hydroxy acids) and, consequently, that it can be viewed as a fairly general process [2-7].

Peptidization of phenylglycine (and of other amino acids) is a condensation reaction which consists in formation of peptide bonds accompanied by the elimination of water molecules, as illustrated by the simple scheme below showing formation of a dipeptide:



Because hydroxy acids can undergo spontaneous oscillatory chiral conversion fully analogous with that observed for amino acids, we were curious to discover whether this property also triggers spontaneous and easy condensation of these compounds. We therefore dissolved lactic and mandelic acids in selected low-molecular-weight solvents, stored the solutions, and then checked them for the presence of the respective polyacids by means of thin-layer chromatography (TLC) and ¹³C NMR spectroscopy. Polarimetric evidence showing oscillatory changes of the specific rotation of solutions of all the compounds investigated (i.e. L-lactic acid, R-mandelic acid, and S-mandelic acid) in 70% aqueous ethanol was also obtained.

Experimental

Chemicals and Reagents

L-(+)-lactic acid was from Fluka (Buchs, Switzerland; #69771), and S-(+) and R-(-)-mandelic acids were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA; #M2004 and #154210, respectively). The structural formula of L-(+)-lactic acid is given in Fig. 1, and those of S-(+) and R-(-)-mandelic acids are given in Figs 2a, b.

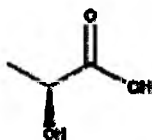


Fig. 1. The chemical structure of L-lactic acid

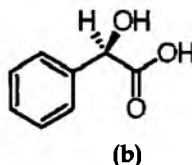
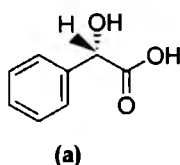


Fig. 2. The chemical structures of (a) S-(+)-mandelic acid and (b) R-(-)-mandelic acid

Copper(II) acetate was analytical grade from POCh (Gliwice, Poland).

Thin-Layer Chromatography (TLC)

Thin-layer chromatography was performed on commercial 20 cm × 20 cm glass plates precoated with 0.25-mm layers of silica gel (Merck, Darmstadt, Germany; #1.05715). Before use the plates were developed with methanol-water 9:1 (v/v), to wash impurities from the adsorbent layer, then dried in air at ambient temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) for 3 h. The pre-developed, dried plates were impregnated by dipping for 2 s in an aqueous solution of $5.01 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ copper(II) acetate. Finally, the impregnated plates were dried for 1 h in a stream of warm air from a hair dryer.

TLC was performed on solutions of L-(+)-lactic acid (10 g L^{-1} ; $1.11 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) and racemic (i.e. R,S-(±)) mandelic acid (10 g L^{-1} ; $6.57 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) in double-distilled water, 70% aqueous ethanol, and pure ethanol. The solutions (5 μL) were applied to the plates 2 cm apart, 1 cm above the lower edge, by use of a Desaga (Heidelberg, Germany) AS 30 autosampler. Nine samples of each acid were applied to each plate; the first

three were dissolved in water, the next three in 70% aqueous ethanol, and the last three in ethanol. One-dimensional development of the chromatograms to a distance of 8.5 cm, with dioxane–water 9:1 (*v/v*) as mobile phase, was performed at ambient temperature (22°C). The chromatograms were then dried at ambient temperature for 3 h. Finally, each chromatographic band was scanned densitometrically, in the direction of development, by use of a Desaga model CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software. Concentration profiles were recorded in reflectance mode, by use of ultraviolet (UV) light from the mercury lamp, at 315 and 305 nm for L-(+)-lactic acid and R,S-(±)-mandelic acid, respectively. The dimensions of the rectangular scanning beam were 0.1 mm × 1.0 mm. Each chromatographic experiment was performed in triplicate.

¹³C NMR Spectroscopy

¹³C NMR spectra at 100 MHz were recorded on a Bruker Avance 400 NMR spectrometer. Solutions (10 mg mL⁻¹) of L-(+)-lactic and S-(+)-mandelic acids in pure ethanol were stored for ten days at 22°C then the ethanol was evaporated, the residues were dissolved in CDCl₃ (99.8%, Armar Chemicals, Switzerland), and tetramethylsilane (TMS) was added as internal reference. Approximately 7000 scans, with a time delay, *D1*, of 8 s between consecutive scans, were sufficient to obtain a good signal-to-noise ratio.

Polarimetry

The optical rotation of the samples at 22°C was measured by means of a Perkin–Elmer (Wellesley, MA, USA) model 341 precision polarimeter. Data were acquired continuously at 5-s intervals for two or more hours, depending on the compound studied. The wavelength used was 589 nm, which corresponds to the sodium D line. The specific rotation $[\alpha]_D$ of the samples was calculated by use of the equation:

$$[\alpha]_D = 100\alpha/cd$$

where α is for the measured rotation (in angle degrees), D is the wavelength (589 nm), c denotes the concentration of the compound in g 100 mL⁻¹ solution, and d is the optical path length in dm.

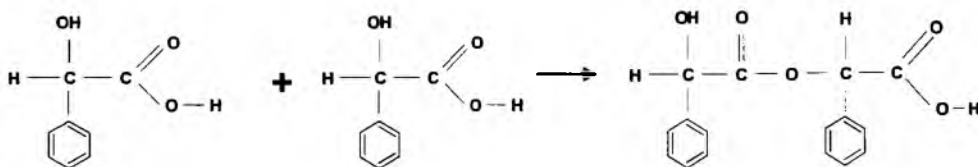
From the literature [8] it is known that the specific rotation of L-(+)-lactic acid at ambient temperature is 2.6°. We obtained an identical value for a freshly prepared solution of L-(+)-lactic acid. A literature survey, however,

revealed a striking variety of specific rotation ($[\alpha]_D$) values reported by different authors for the *S* and *R* antimers of mandelic acid. As reported in Refs 9–11, $[\alpha]_D$ for the *S* enantiomer is 156° in water and 151.5° in ethanol. Reported $[\alpha]_D$ values for *R*-(-)-mandelic acid are -154.2° in water [10], -153.5 in ethanol [11], and -155.0° in 95% aqueous ethanol [12] (these results are valid for solutions at ambient temperature).

Our polarimetric experiments were performed on solutions of L-(+)-lactic acid (50 g L^{-1} ; $5.55 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) and *S*-(+) and *R*-(-)-mandelic acids (each 85 g L^{-1} ; 5.59 mol L^{-1}) in 70% aqueous ethanol.

Results and Discussion

One objective of this study was to amass convincing experimental evidence of spontaneous condensation of the chiral hydroxy acids similar to the spontaneous peptidization of phenylglycine, reported elsewhere [1]. A simple schematic diagram of such a condensation is that given below illustrating the formation of dimandelic acid.



In our opinion, the process of condensation of the hydroxy acids investigated might be triggered by their oscillatory chiral conversion, which is a non-linear process. To this effect, we performed continuous polarimetric recording of the optical rotation of L-(+)-lactic acid and *S*-(+) and *R*-(-)-mandelic acids and the calculated $[\alpha]_D$. The condensation products were detected by means of TLC and ^{13}C NMR spectroscopy. The experimental results obtained are presented in the forthcoming sections.

Polarimetry

Continuous measurement of $[\alpha]_D$ for L-(+)-lactic acid and *S*-(+) and *R*-(-)-mandelic acids is reported for the first time in this paper; the results obtained clearly show the dynamic oscillations of these values. Similar results, although recorded at 10 or 15-min intervals only, have already been presented elsewhere [7, 13].

From the results shown in Figs 3–5 it is apparent that L-(+)-lactic acid and *S*-(+) and *R*-(-)-mandelic acids undergo dynamic chiral conversion

when stored at 22°C as solutions in 70% aqueous ethanol. It seems highly probable that the oscillatory chiral conversion of these three hydroxy acids is an inevitable precondition which, during the enolization step, triggers condensation of the acids.

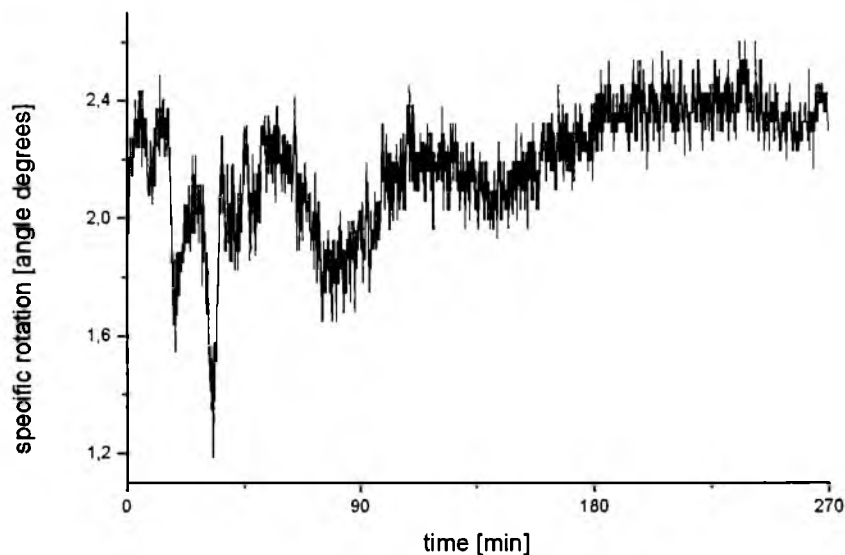


Fig. 3. Oscillatory changes of specific rotation, $[\alpha]_D$, as a function of sample storage time, for L-(+)-lactic acid dissolved in 70% aqueous ethanol and stored at 22°C

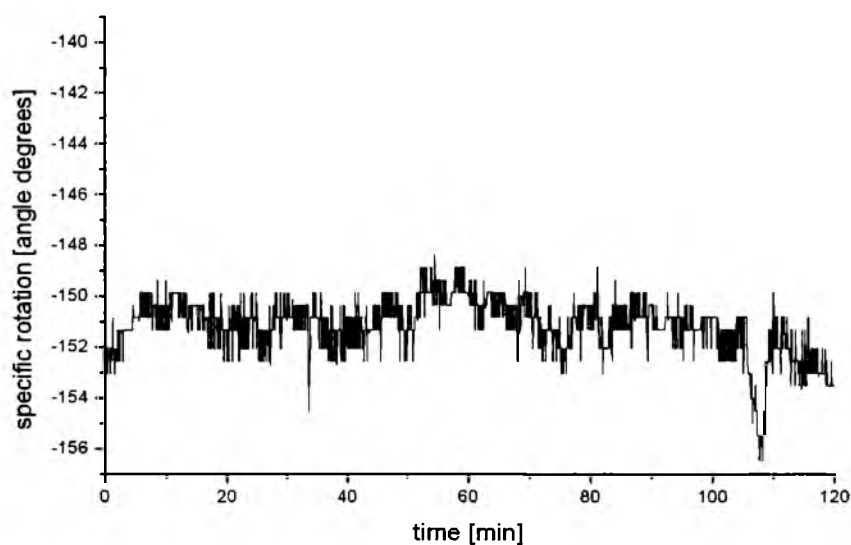


Fig. 4. Oscillatory changes of specific rotation, $[\alpha]_D$, as a function of sample storage time, for R-(-)-mandelic acid dissolved in 70% aqueous ethanol and stored at 22°C

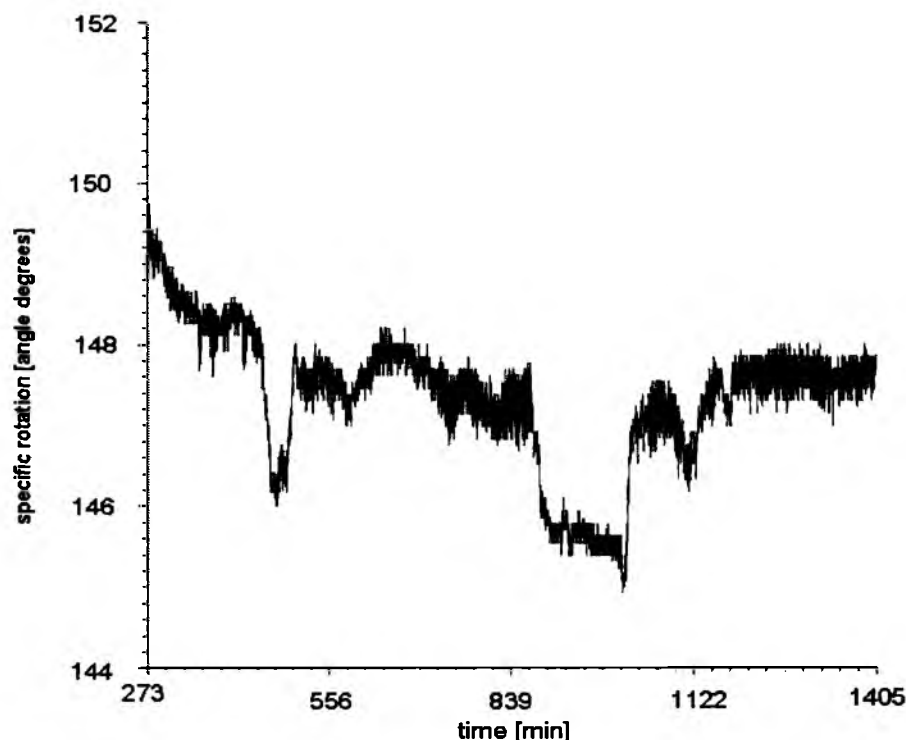


Fig. 5. Oscillatory changes of specific rotation, $[\alpha]_D$, as a function of sample storage time, for S-(+)-mandelic acid dissolved in 70% aqueous ethanol and stored at 22°C

Thin-Layer Chromatography (TLC)

In our earlier paper on the spontaneous rapid peptidization of phenylglycine in abiotic aqueous media [1], in the first instance we used TLC to reveal this striking phenomenon. We provided densitometric evidence showing that as a result of partial peptidization of the amino acid the peptide fraction remained at the origin of the chromatogram whereas the monomeric fraction moved along the chromatographic plate with the mobile phase. It seemed understandable that the immobility of the peptide fraction was because of the increased molecular weight of peptide units (compared with the monomeric amino acid) and also because of accumulation of polar functionality in each such unit. In this study we expected that condensation of the investigated hydroxy acids and formation of the respective polyacids could be demonstrated analogously.

To achieve this we dissolved L-(+)-lactic acid, S-(+)-mandelic acid, and R,S-(±)-mandelic acid in each of three different solvents, i.e., in pure water, 70% aqueous ethanol, and pure ethanol, left the solutions for a few days,

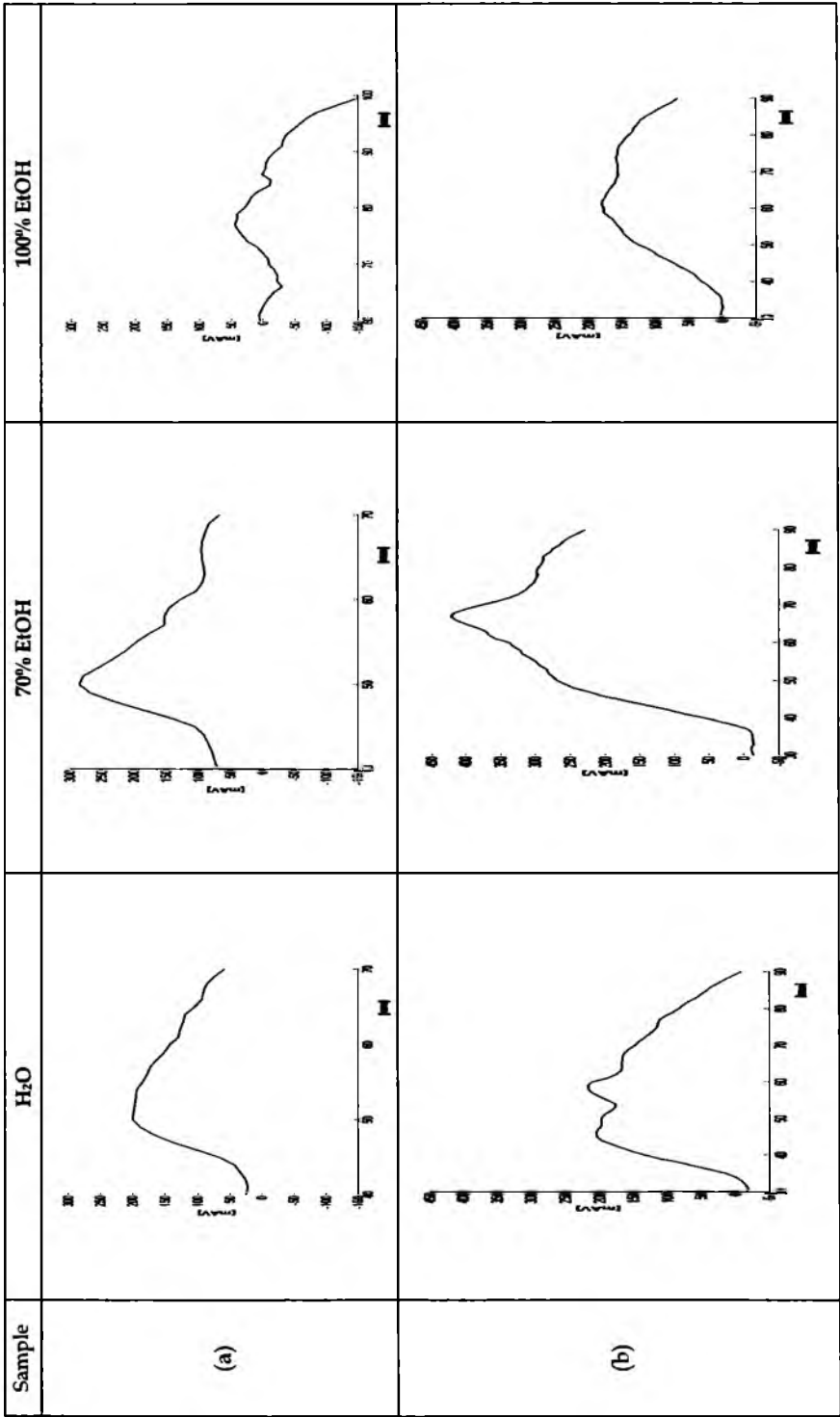


Fig. 6. Comparison of the concentration profiles of the deposits at the origins of the chromatograms for samples of (a) L-(+)-lactic acid and (b) R,S-(±)-mandelic acid, showing the dependence of the amounts on the solvent used. The solutions of the acids were stored for 2 days

and finally chromatographed them. In each case, one fraction originating from the investigated sample remained at the origin whereas the rest of the sample moved along the chromatographic plate with the mobile phase. It is worthy of note that for all the hydroxy acids investigated the amount of the sample remaining at the origin depended on the solvent used. The largest amount was observed for 70% aqueous ethanol, the next largest for pure water, and the smallest amount for pure ethanol. As an example, in Fig. 6 we present concentration profiles of the deposits at the origins of the chromatograms recorded for samples of L-(+)-lactic acid and R,S-(±)-mandelic acid (in qualitative terms, the results obtained for S-(+)-mandelic acid were analogous).

It seemed rather obvious that deposits at the chromatogram origins represented a given polyacid (in Fig. 6, these are polylactic and polymandelic acids, respectively). The presence of this deposit is proof of the spontaneous and relatively easy condensation of these hydroxy acids in solution. Most probably, condensation of the hydroxy acid starts from the enol obtained from the acid. If so, then 70% ethanol provides the best conditions for condensation (with the largest sample deposit at the origin); pure water is less favourable (because water molecules are eliminated as a condensation product during the course of the reaction), and pure ethanol provides the worst conditions (because the condensation mechanism involves dissociation of chemical bonds and transfer of charged structural units, which can only be effective in the presence of water) hence the respective sample deposit at the origin is the lowest).

¹³C NMR Spectroscopy

The ¹³C NMR spectrum of L-(+)-lactic acid first stored for ten days in pure ethanol then, after removal of the ethanol, dissolved in deuterated chloroform, is given in Fig. 7. The main peaks at 20.19, 66.54, and 179.77 ppm can be attributed, respectively, to the methyl, asymmetric (C-2), and carbonyl carbon atoms of the monomeric lactic acid. In the vicinity of each of these three peaks we observe three new low-intensity peaks which can be attributed to the analogous carbon atoms, although in the repeating units of polylactic acid. Thus the signal originating from the methyl carbon atom occurs at 20.36 ppm, that from asymmetric carbon atom in the main chain at 68.94 ppm, and that from carbonyl carbon atom at 175.12 ppm.

Analogous peaks indicating formation of polymandelic acid can be observed in the ¹³C NMR spectrum of S-(+)-mandelic acid first stored for ten days in pure ethanol and then, after removal of the ethanol, dissolved in deuterated chloroform, although they are less distinct than for polylactic

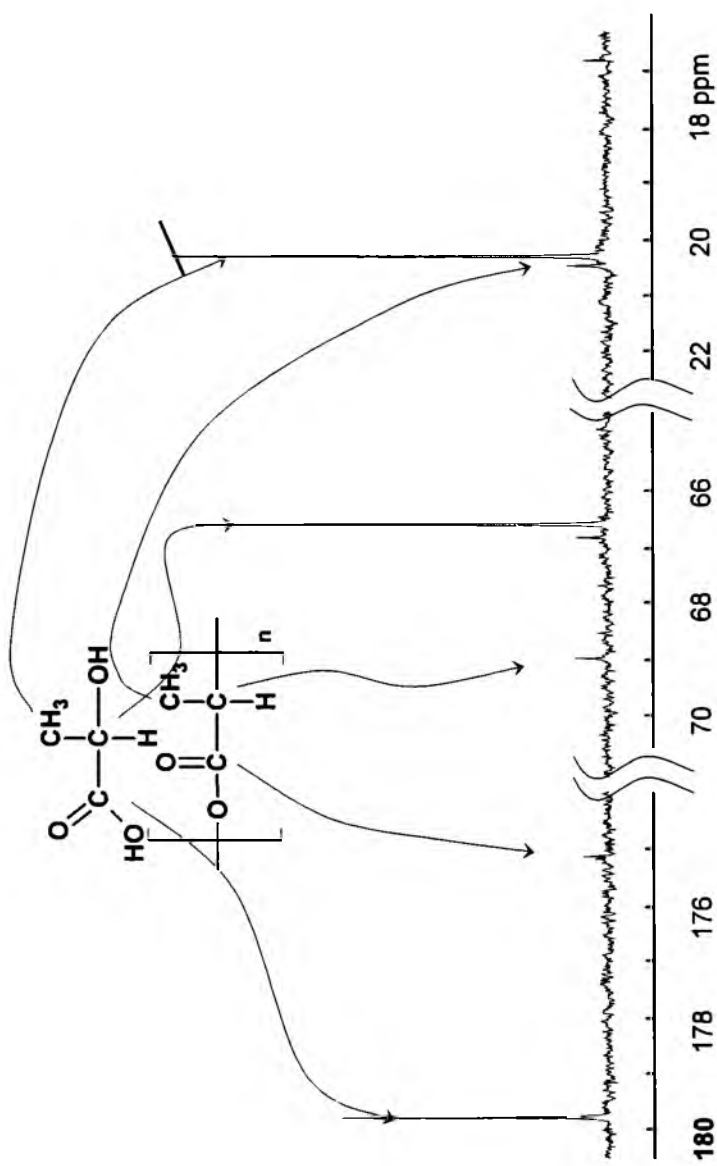


Fig. 7. 100-MHz ¹³C NMR spectrum of L-(+)-lactic acid, first dissolved and stored for ten days in pure ethanol, then recorded in CDCl₃ at 25°C

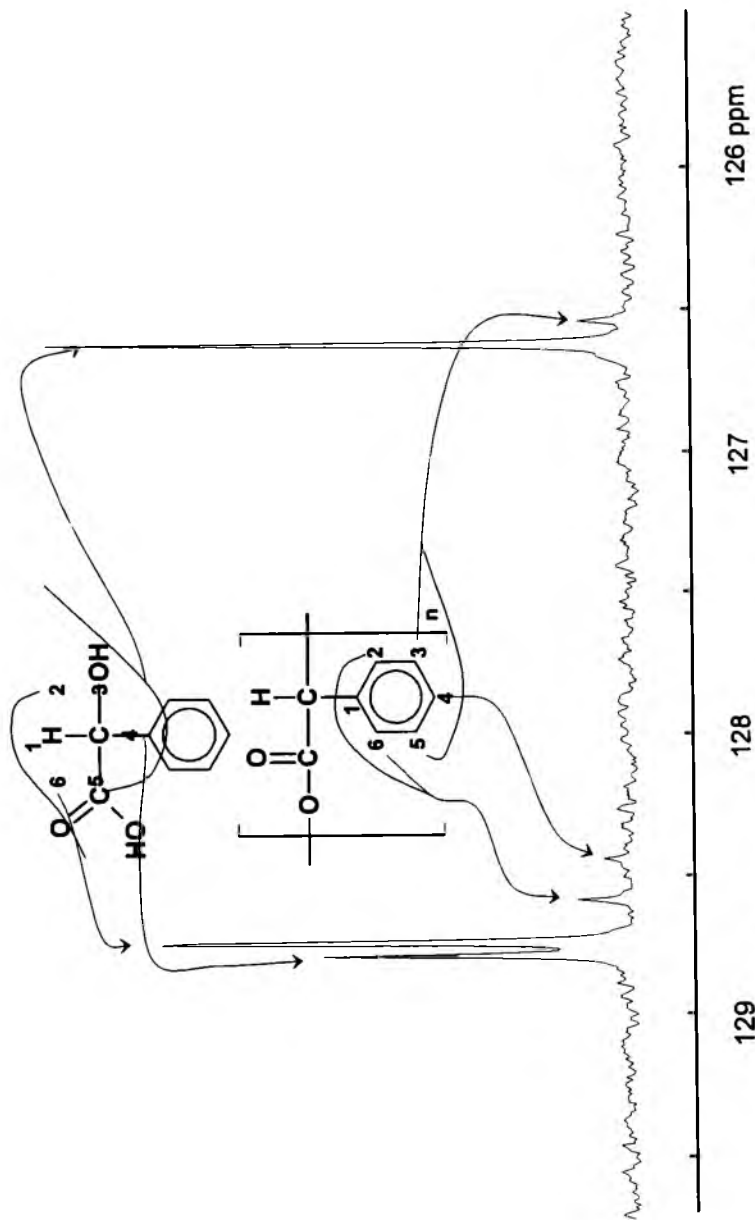


Fig. 8. 100-MHz ^{13}C NMR spectrum of *S*-(+)-mandelic acid, first dissolved and stored for ten days in pure ethanol, then recorded in CDCl_3 at 25°C

acid. Fig. 8 shows the aromatic region of the ^{13}C NMR spectrum of mandelic acid. In the vicinity of the signal originating from the 3,5-aromatic carbon atoms at 126.76 ppm, a low-intensity peak at 126.68 ppm can be observed; this can be attributed to the analogous carbon atoms in the repeating units of polymandelic acid. The peaks of C2 and C6 carbon at 128.88 ppm, and of C-4 carbon at 128.93 ppm in the aromatic ring of mandelic acid are also flanked by small peaks at 128.59 and 128.74 ppm, respectively, which can be attributed to the analogous carbon atoms in the repeating units of polymandelic acid.

The chemical shifts of the equivalent carbon atoms located in the end groups of both polyacids should be noticeably different from those of the carbon atoms situated in the central repeating units. These signals are not observed in the recorded spectra, however, which suggests a rather large number of the repeating units in the polymers and formation of relatively long polyacid chains.

Conclusions

- In this study we demonstrated the ability of the hydroxy acids lactic acid and mandelic acid to undergo spontaneous condensation, resulting in the respective polyacids.
- Formation of polylactic acid and polymandelic acid was demonstrated by means of TLC and ^{13}C NMR spectroscopy.
- The mechanism of spontaneous condensation of chiral hydroxy acids resembles that of amino acid peptidization in the sense that both condensation and peptidization seem a direct outcome of spontaneous oscillatory chiral conversion of the respective chiral carboxylic acids.
- The ability of hydroxy carboxylic acids to condense and form polyacids seems to be as general (almost a law of nature) as their ability to undergo spontaneous oscillatory chiral conversion (extensively discussed elsewhere by these authors).

Acknowledgement

The work of two of the authors (M.G. and D.K.) was partially supported by PhD scholarships granted to them in 2008 within the framework of the 'University as a Partner of the Economy Based on Science' (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union.

References

- [1] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **21**, 151–160 (2009)
- [2] M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **15**, 131–149 (2005)
- [3] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, Ł. Wojtal, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **18**, 227–238 (2007)
- [4] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.*, **21**, 43–47 (2008)
- [5] M. Sajewicz, M. Gontarska, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **31**, 1986–2005 (2008)
- [6] M. Sajewicz, D. Kronenbach, D. Staszek, M. Wróbel, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **31**, 2006–2018 (2008)
- [7] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **20**, 209–225 (2008)
- [8] R.E. Kirk and D.F. Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 8, p. 168, The Interscience Encyclopedia, New York, 1952
- [9] <http://www.crossfirebeilstein.com/>
- [10] J. Schiffrers, T. Rantanen, F. Schmidt, W. Bergmans, L. Zani, and C. Bolm, *J. Org. Chem.*, **71**, 2320–2331 (2006)
- [11] P.L. Polavarapu, L.P. Fontana, and H.E. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 94–99 (1986)
- [12] C.P. Whitman, J.G. Craig, and G.L. Kenyon, *Tetrahedron*, **41**, 1183–1192 (1985)
- [13] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, M. Wróbel, R. Piętka, and T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.*, submitted for publication

On the Spontaneous Condensation of Profens, with Ketoprofen as an Example

M. MATLENGIEWICZ, M. SAJEWICZ, M. GONTARSKA, D. KRONENBACH,
AND T. KOWALSKA*

Institute of Chemistry, Silesian University,
9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland
E-mail: kowalska@us.edu.pl

Summary. In a series of recently published full-length papers and short communications we attempted to gain deeper insight into elementary reactions which might contribute to the non-linear nature of the spontaneous chiral conversion of low-molecular-weight carboxylic acids. Earlier, we succeeded in demonstrating that amino acids and hydroxy acids can undergo spontaneous peptidization and spontaneous esterification (both regarded as condensation), respectively, when dissolved in 70% aqueous ethanol. In this study we provide experimental proof from thin-layer chromatography and ^{13}C NMR spectroscopy of spontaneous condensation of profens, with ketoprofen as an example. It can be expected that other profen drugs undergo an analogous condensation. In the future, an analogy between the ability of amino acids, hydroxy acids, and profens to undergo spontaneous peptidization or condensation (as reported in our papers), and the ability of selected organosilanols to undergo the spontaneous oscillatory condensation (as reported elsewhere), might prove essential for better understanding of detailed mechanism of the spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion of the selected low-molecular-weight carboxylic acids.

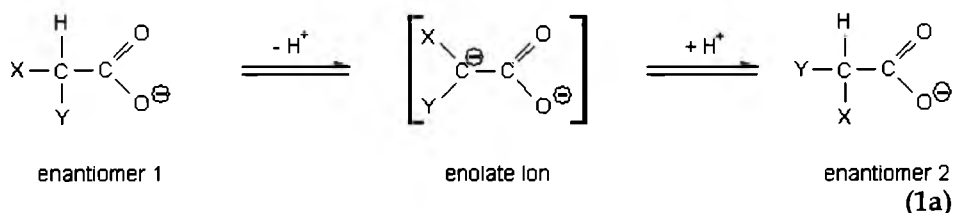
Key Words: ketoprofen, abiotic condensation, oscillatory chiral conversion

Introduction

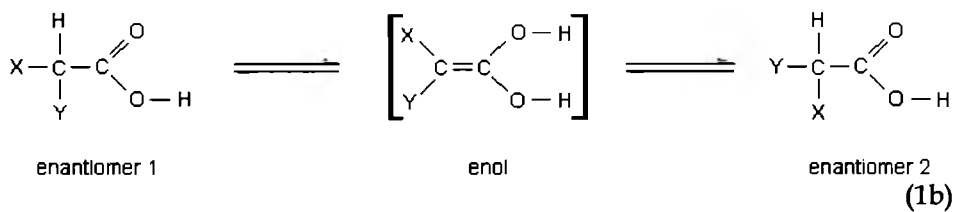
In our earlier papers [1–6] we have reported the spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion of profens, amino acids, and hydroxy acids in abiotic aqueous ethanol solutions. The general scheme of this chiral conversion can simply be given by eq. (1):



If, however, we consider chiral conversion of these carboxylic acids in aqueous solutions more closely, eq. (1) can be replaced by eq. (1a) [7]:



In anhydrous media and in the presence of trace amounts of water, the probable mechanism of chiral conversion can be given by eq. (1b) [8]:



where X is $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{Ar}$, etc., and Y is $-\text{R}$, etc.

In previous publications [9, 10], a simple theoretical model of the spontaneous oscillatory chiral conversion was introduced, and named the 'two linked templators' model. This model benefits from the physicochemical concept of another oscillator, named the 'templator' [11, 12] and takes into the account the experimentally proved chiral conversion of simple carboxylic acids. It does not, however, contain any realistic proposal of a chemical reaction with an oscillatory intermediate which might be responsible for the observed oscillatory nature of chiral conversion.

Quite recently, we have succeeded in obtaining experimental evidence that these amino acids and hydroxy acids not only undergo chiral conversion but also spontaneous condensation [13, 14]. The ability of *R*-phenylglycine and *S*-phenylglycine (dissolved in 70% aqueous ethanol) to undergo practically instantaneous peptidization, was demonstrated by TLC and the Biuret test [13]. An analogous (although less rapid) outcome was observed for *L*-alanine and *L*-phenylalanine also. Experimental evidence of spontaneous esterification of selected hydroxy acids [i.e. *L*-lactic acid and *S*-(+)-mandelic acid] has also been obtained [14]. The dynamics of spontaneous peptidization with amino acids and esterification with hydroxy acids in aqueous ethanol has not yet been studied and, hence, it cannot be concluded whether it is non-linear or linear in nature. Moreover, an ability of profens to undergo a spontaneous condensation when dissolved in aqueous

ethanol has not previously been demonstrated. The objective of this study was, therefore, to investigate the ability of ketoprofen, as an important representative of profen drugs, to undergo spontaneous condensation.

Experimental

Reagents

The molecular structure of ketoprofen is given in Fig. 1. In our TLC study, we used *S,R*-(±)-ketoprofen, manufactured by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA; cat. #K1751) and in our ^{13}C NMR study, we used *S*-(+)-ketoprofen manufactured by Sigma-Aldrich (cat. #471909). Both compounds were dissolved in 70% aqueous ethanol. The concentration of *S,R*-(±)-ketoprofen was 0.1 g L^{-1} (i.e., ca $3 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$) and that of *S*-(+)-ketoprofen was 10 g L^{-1} (i.e. ca $3 \times 10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$).

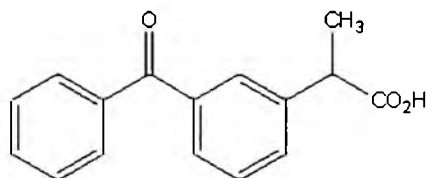


Fig. 1. The chemical structure of ketoprofen

Thin-Layer Chromatography (TLC)

TLC was performed on commercial glass plates (20 cm × 20 cm) precoated with 0.25 mm layers of silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany; cat. #1.05715). Before use, the plates were washed by predevelopment with methanol–water 9:1 (*v/v*) then dried at ambient temperature for 3 h.

The chromatographic experiment was performed on three plates. Samples were applied to the plates by means of a Desaga (Heidelberg, Germany) AS 30 automatic sampler applicator. *S,R*-(±)-ketoprofen solutions (5 or 10 μL per spot) were applied to the plates 1.5 cm above the lower edge. Nine samples were applied, 2 cm apart and 2 cm from the side edges.

One-dimensional ascending development of the *S,R*-(±)-ketoprofen samples (stored for 3 h at 22°C) with the binary mobile phase acetonitrile (ACN)–water (H₂O) 5:1 (*v/v*) plus several drops of glacial acetic acid was performed in normal (Stahl-type) chromatographic tanks after their saturation for 0.5 h. The development distance was 15 cm.

Densitograms were acquired for each chromatogram, at 1-mm intervals, with a Desaga CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible Pro Quant software. Concentration profiles were recorded in UV light at 252 nm from the deuterium lamp (in reflectance mode). The dimensions of the rectangular light beam were 2.0 mm \times 0.1 mm. The maxima of the concentration profiles were used for calculation of R_F values.

^{13}C NMR Spectroscopy

^{13}C NMR spectra at 100 MHz were recorded on a Bruker Avance 400 NMR spectrometer. Two solutions (10 mg mL⁻¹) of *S*-(+)-ketoprofen in 70% aqueous ethanol were investigated, one freshly prepared and the other stored for a year at 22°C. The solvent was first evaporated from each sample, the residue was dissolved in CDCl₃ (99.8%, Armar Chemicals, Switzerland), and tetramethylsilane (TMS) was added as internal reference. Approximately 7000 scans, with a time delay, *D1*, of 8 s between consecutive scans, were sufficient to obtain a good signal-to-noise ratio.

Results

Thin-Layer Chromatography (TLC)

The TLC results presented in this study originate from the enantioseparation experiment extensively discussed elsewhere [15]. The densitograms in Fig. 2 show the deposits at the origins left after application of 5 μL (Fig. 2a) or 10 μL (Fig. 2b) *R,S*-(+)-ketoprofen solution to the plate and development of the chromatograms. The chromatograms were densitometrically scanned immediately after development and drying. The deposits shown in Fig. 2 proved immobile in the chromatographic process, hence the respective R_F values for both peaks were 0 (+0.02).

This result seems to suggest that *S,R*-(\pm)-ketoprofen dissolved in 70% aqueous ethanol and stored for 3 h undergoes relatively rapid (and, of course, only partial) condensation. This supposition is based on the fact that the deposits observed at the origins proved immobile, so their molecular weight ought to be substantially higher than that of ketoprofen (the R_F values observed for the separated ketoprofen species were >0.80 [15]). One can conclude that condensation yields were low after storage of the sample for 3 h by comparing the peak intensity for the deposit at the origin with that for the separated ketoprofen species [15].

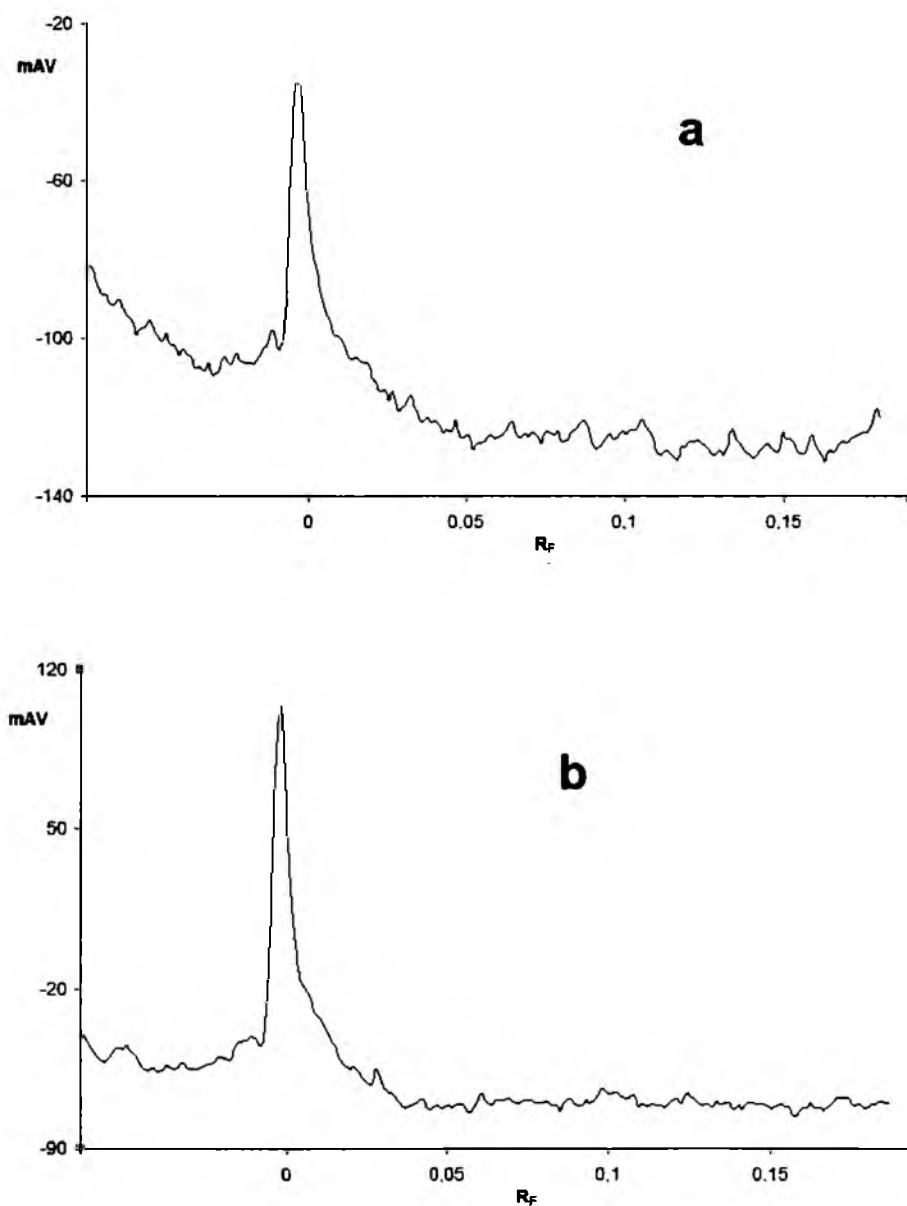


Fig. 2. Densitograms showing immobilized deposits at the origins of the chromatograms obtained from freshly prepared *R,S*-(±)-ketoprofen solution. The deposits originated from 0.1 g L⁻¹ ketoprofen in 70% aqueous ethanol; the amounts spotted were (a) 5 μL and (b) 10 μL

^{13}C NMR Spectroscopy

A schematic diagram of the expected mechanism of ketoprofen condensation is shown in Fig. 3. As a result one should expect ^{13}C NMR spectroscopic evidence of this process in the three regions (i.e. the aliphatic, aromatic, and carbonyl regions) of the spectrum obtained from the *S*-(+)-ketoprofen sample stored for one year compared with that obtained from the freshly prepared sample (Figs 4–6).

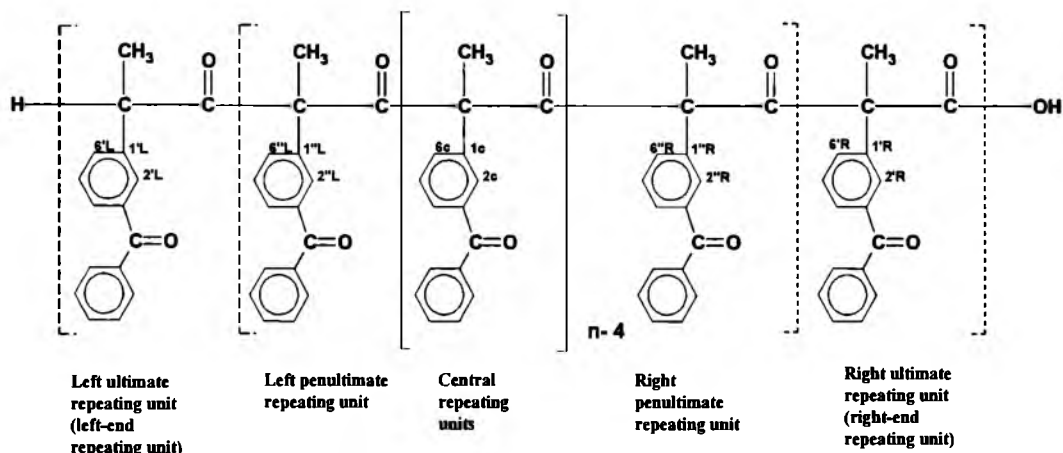


Fig. 3. Expected mechanism of ketoprofen condensation

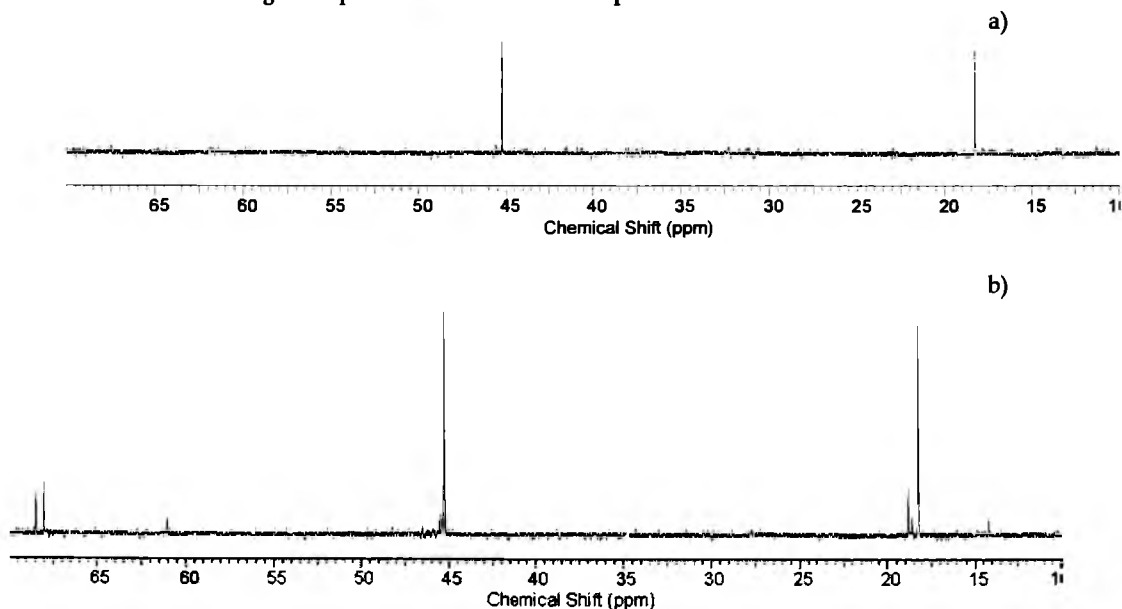


Fig. 4. 100 MHz ^{13}C NMR spectra of *S*-(+)-ketoprofen in the aliphatic region: (a) fresh sample; (b) aged sample

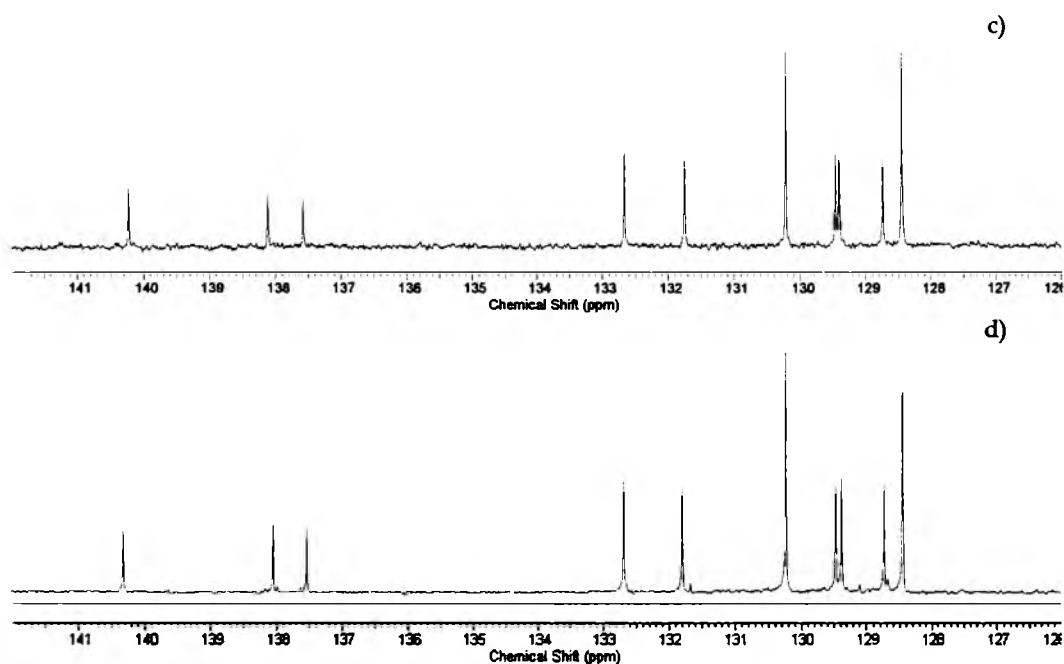


Fig. 5. 100 MHz ^{13}C NMR spectra of *S*-(+)-ketoprofen in the aromatic region:
(a) fresh sample; (b) aged sample

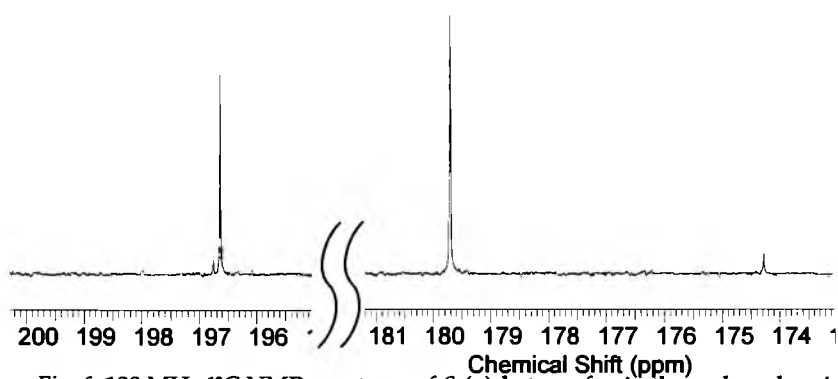


Fig. 6. 100 MHz ^{13}C NMR spectrum of *S*-(+)-ketoprofen in the carbonyl region

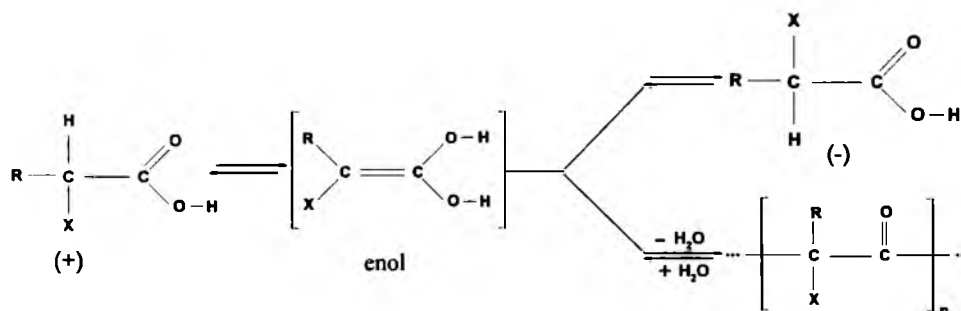
The aliphatic regions of the ^{13}C NMR spectra obtained from fresh (Fig. 4a) and aged (Fig. 4b) *S*-(+)-ketoprofen solution are presented in Fig. 4. From comparison of the spectra it is apparent that the methyl peak at 18.26 ppm in Fig. 4a is accompanied by two additional lines at 18.61 and 18.81 ppm in Fig. 4b; these originate from the methyl groups in the repeating units of the condensate. The signal of the methine carbon at 45.31 ppm

in Fig. 4a is flanked by a new small line at 45.55 in Fig. 4b which comes from the end groups. The new lines at 68.03 and 68.51 ppm in Fig. 4b originate from new quaternary carbon atoms formed in the main chain of the condensate.

The aromatic regions of the ^{13}C NMR spectra are presented in Fig. 5. From comparison of the two spectra it can be seen that in the spectrum of the aged sample (Fig. 5b) two small new peaks appear at 129.09 and 131.65 ppm which are absent from the spectrum of the fresh prepared sample (Fig. 5a); these can be attributed to C-2' and C-6', respectively, in the new molecular environment of the ketoprofen condensate.

The carbonyl regions of the ^{13}C NMR spectra are presented in Fig. 6. After storage for a year the carbonyl signal at 179.68 ppm in the freshly prepared sample is flanked by two additional lines, at 174.29 and 196.76 ppm which appear in the aged sample only.

Thus on the basis of the results presented in this study it seems justified to expect that storage of ketoprofen solution (and, most probably, solutions of the other profens also) in 70% aqueous ethanol follows the pattern of two spontaneous and parallel processes. One process is the oscillatory chiral conversion and the other is condensation. So far, nothing is known about the dynamics of the condensation, i.e., whether it is linear, or non-linear in nature. A schematic summary of this complex parallel process, as it is currently understood, is given in the scheme below.



where R is $-\text{CH}_3$ and X is $-\text{Ar}$.

Conclusions

By means of thin-layer chromatography and ^{13}C NMR spectroscopy, it was proved that ketoprofen undergoes spontaneous condensation, when dissolved in 70% aqueous ethanol. It is to be expected that this condensation occurs with other profens also.

It is noteworthy that spontaneous condensation of some organosilanols [e.g., $R_2Si(OH)_2$ and $RR'Si(OH)_2$] has been reported [16, 17] and proved to be oscillatory in nature. There are several analogies between the results presented in these two papers and those obtained in our research – including the analogous structures of the enol shown in eq. (1b) and those of the organosilanols [16, 17]. These analogies suggest that the process of spontaneous condensation of low-molecular-weight carboxylic acids might also be oscillatory in nature. Hence, scrutiny of the dynamics of the spontaneous condensation of the low-molecular-weight carboxylic acids should be the next vital step in this research project.

Acknowledgment

The work of two authors (M.G. and D.K.) was partially supported by PhD scholarships granted to them in 2008 within the framework of the 'University as a Partner of the Economy Based on Science' (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union.

References

- [1] M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **15**, 131 (2005)
- [2] M. Sajewicz, M. Gontarska, M. Wróbel, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **30**, 2193 (2007)
- [3] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.*, **21**, 43 (2008)
- [4] M. Sajewicz, D. Kronenbach, D. Staszek, M. Wróbel, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **31**, 2006 (2008)
- [5] M. Sajewicz, E. John, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **20**, 367 (2008)
- [6] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, M. Wróbel, R. Piętka, and T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.*, **22**, 241 (2009); DOI: 10.1556/JPC.2009.1001
- [7] P. Belanger, J.G. Atkinson, and R.S. Stuart, *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.*, 1067 (1969)
- [8] Y. Xie, H. Liu, and J. Chen, *Int. J. Pharm.*, **196**, 21 (2000)
- [9] M. Sajewicz, M. Gontarska, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **31**, 1986 (2008)
- [10] M. Sajewicz, R. Wrzałik, M. Gontarska, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **32**, 1359 (2009)
- [11] E. Peacock-Lopez, D.B. Radov, and C.S. Flesner, *Biophys. Chem.*, **65**, 171 (1997)
- [12] L.L. Tsai, G.R. Hutchinson, and E. Peacock-Lopez, *J. Chem. Phys.*, **113**, 2003 (2000)

- [13] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **21**, 151 (2009)
- [14] M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **21**, 259 (2009)
- [15] M. Sajewicz, G. Grygierczyk, M. Gontarska, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **30**, 2185 (2007)
- [16] P.V. Ivanov, V.I. Maslova, N.G. Bondareva, O.A. Yur'eva, N.V. Kozlova, E.A. Chernyshev, K. Yu. Odintsov, and E.A. Zykunova, *Rus. Chem. Bull.*, **46**, 2138 (1997)
- [17] E.A. Chernyshev, P.V. Ivanov, and D.N. Golubykh, *Rus. Chem. Bull.*, **50**, 1998 (2001)

Accepted by MWH

Spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion of simple carboxylic acids and its possible mechanism

Mieczysław Sajewicz^a, Marek Matlengiewicz^a, Marcin Leda^b,
Monika Gontarska^a, Dorota Kronenbach^a, Teresa Kowalska^a
and Irving R. Epstein^{b*}

In earlier studies, we have collected experimental evidence (mostly from thin-layer chromatography and polarimetry) on the spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion of simple carboxylic acids dissolved in 70% aqueous ethanol. To elucidate this phenomenon, we developed a simple theoretical model of two linked Templators. Recently, we have obtained additional experimental evidence of the spontaneous condensation of chiral carboxylic acids, based on the biuret test (amino acids), high performance liquid chromatography, and ¹³C NMR spectroscopy (profens and hydroxy acids). We briefly describe our experimental results in the context of the existing literature and outline an improved theoretical model for these phenomena. Our system resembles in some respects the reported oscillatory condensation of organic silanols. Here, the key reaction is the formation of carboxylic acid-derived enols. Finally, we discuss the importance of the oscillatory chiral conversion of simple carboxylic acids for biochemistry, pharmacology, and related life sciences. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: chiral carboxylic acids; condensation; enolization; oscillatory chiral conversion; Templator model

INTRODUCTION

The remarkable phenomenon of spontaneous *in vitro* oscillatory chiral conversion of selected profens, amino acids, and hydroxy acids has been the focus of our attention for some time. In papers,^[1–3] we reported on the oscillatory chiral conversion of *S*(+)-ibuprofen, *S*(+)-naproxen, *S*,*R*(±)-2-phenylpropionic acid, *S*(+)-flurbiprofen, *R*(-)-flurbiprofen, and *S*,*R*(±)-ketoprofen. In papers,^[4–6] we described analogous behavior in *L*-alanine, *L*-α-phenylalanine, and *L*-tyrosine.^[4–6] In papers,^[7,8] the oscillatory chiral conversion of the hydroxy acids *L*-lactic acid, *R*-α-hydroxybutyric acid, *S*-α-hydroxybutyric acid, *R*-mandelic acid, and *S*-mandelic acid was characterized. Most of these oscillatory chiral conversion reactions took place in acidic samples dissolved in 70% aqueous ethanol. Oscillatory chiral conversion has also been reported in the crystallization of the (+) and (–) enantiomers of 2-azabicyclo [2.2.1]hept-5-en-3-one^[9].

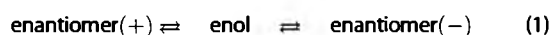
Much of the experimental evidence for this phenomenon originates from thin-layer chromatography (TLC) and polarimetry. The TLC evidence is mostly in the form of changing concentration profiles and unstable retardation coefficient (*R_F*) values of the investigated analytes. In Fig. 1, we present an example of TLC results for *S*,*R*(±)-2-phenylpropionic acid dissolved in 70% aqueous ethanol and then stored for 72 h at 22 °C, with intermittent chromatographic measurements on the stored sample.^[1]

Polarimetric evidence was collected in the non-continuous and continuous registration modes. In Fig. 2(a, b), we show examples of the long-term chiral conversion of *S*(+)- and *R*(-)-flurbiprofen dissolved in 70% aqueous ethanol and then stored at 22 °C for several days.^[3] These data were collected in the non-continuous registration mode.

In Fig. 3, we present the continuously registered oscillatory changes of the specific rotation ([α]_D) for a freshly prepared 70%

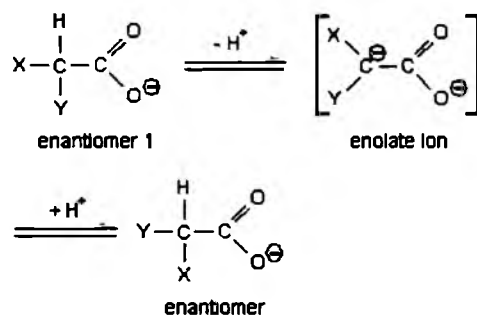
aqueous ethanol solution of *R*(-)-flurbiprofen, with monitoring carried out for 540 min.

The general scheme of these chiral conversions can be summarized as



If we consider chiral conversion of selected carboxylic acids in an aqueous solution in more detail, then Eqn (1) can be replaced by Eqn (1a)^[10]:

(1a)

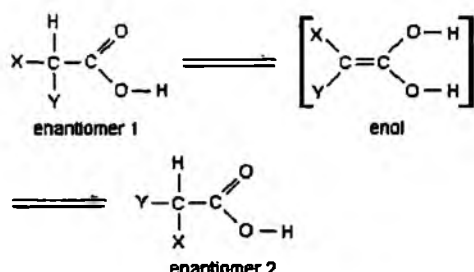


* Correspondence to: I. R. Epstein, Chemistry Department, MS 015, Brandeis University, Waltham, MA 02454-9110, USA.
E-mail: epstein@brandeis.edu

a M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, D. Kronenbach, T. Kowalska
Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

b M. Leda, I. R. Epstein
Chemistry Department, MS 015, Brandeis University, Waltham, Massachusetts 02454-9110, USA

In anhydrous media and in the presence of trace amounts of water, the probable mechanism of chiral conversion is given by Eqn (1b).^[11]



where X: -NH₂, -OH, -Ar, etc., and Y: -R, etc.

MODELING STUDIES

Based on the reaction scheme (Eqn (1)), in paper^[5] we proposed a simple model of chiral conversion, adapting an earlier oscillatory mechanism designated as the Templator.^[12,13] Here, we propose two models which may explain the observed oscillation in these experimental systems. The first model is based on autocatalytic dimerization. Oscillations appear in this model in both enantiomer subsystems. Racemization is a linear reversible reaction coupling the two oscillating subsystems. In such a system, in addition to simple oscillations, quasiperiodic (Fig. 4) and mixed mode oscillations consisting of mixtures of large and small amplitude oscillations are possible as well. Instability of the stationary state leading to pattern formation in a spatially extended system is also possible, because such instability requires that the diffusion coefficient of dimers be smaller than that of monomers, which is physically reasonable.

In our model we consider the concentrations of enantiomers S, R and their homodimers S₂, R₂. We assume that the dimerization reaction may be uncatalyzed

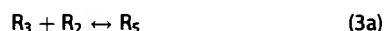


or catalyzed by the dimers themselves (autocatalysis):



For simplicity, we ignore the formation of heterodimers, though it is only necessary to assume that this process is much slower than homodimer formation.

We also consider a reservoir of oligomers, which acts as a sort of buffer, able to remove dimers and introduce monomers into the system. Dimers may be removed by the creation of oligomers R₅, S₅, Q, and P.



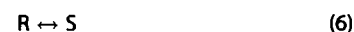
If we make a quasi-steady state approximation for [R₅] and assume that the total concentrations [R₃] + [R₅], [S₃] + [S₅], and [Q] are roughly constant, the rate of removal of dimers is

not linear but is instead proportional to $k_2 b_2 / (1 + b_2)$ where b_2 denotes [R₂].

Monomers are introduced to the system from the reservoir by reactions like



The rates of steps (5a) and (5b) are constant and small but differ because the concentrations of S and R in the reservoir are different. We assume that racemization is a simple linear reaction



The behavior of the system defined above is described by four dimensionless kinetic equations

$$da_1/dt = \epsilon(k_{01} + k_1(b_1 - a_1^2) - 2a_1^2 b_1 + k_3(a_2 - a_1)) \quad (7a)$$

$$db_1/dt = a_1^2 b_1 - k_1(b_1 - a_1^2) - \frac{k_2 b_1}{1 + b_1} \quad (7b)$$

$$da_2/dt = \epsilon(k_{02} + k_1(b_2 - a_2^2) - 2a_2^2 b_2 - k_3(a_2 - a_1)) \quad (8a)$$

$$db_2/dt = a_2^2 b_2 - k_1(b_2 - a_2^2) - \frac{k_2 b_2}{1 + b_2} \quad (8b)$$

where a_1 , b_1 , a_2 , and b_2 are the dimensionless concentrations of S, S₂, R and R₂, respectively, and k_{01} , k_{02} , k_1 , k_2 , and k_3 are dimensionless constants which are functions of the rate constants of reactions (1)–(6).

At least two observations support the use of the model described above. First, autocatalytic dimerization has been found in chemical reactions in which the breaking of the mirror symmetry of enantiomers occurs (Soai reaction^[14]). Second, oscillations based on autocatalytic dimerization should be more robust at lower temperature, because the dimerization equilibrium (1) should then be shifted toward the formation of dimers. More robust oscillations are indeed seen at lower temperatures in our experiments^[14,6].

The second approach is based on the model of Plasson *et al.*^[15]. In this model, oscillations appear as the result of coupling between enantiomers. This model appears particularly relevant for systems involving condensation or peptidization in which the condensate (dipeptide) SR has different chemical properties than RS, e.g., where only the residue on the left undergoes epimerization.



Oscillations appear in the system (9)–(13) only if the rate constant for the formation of heterodimers (12) is greater than that for homodimers (10) (Fig. 5).

Our model of two linked Templators accounts for the experimentally observed chiral conversion of simple carboxylic acids.

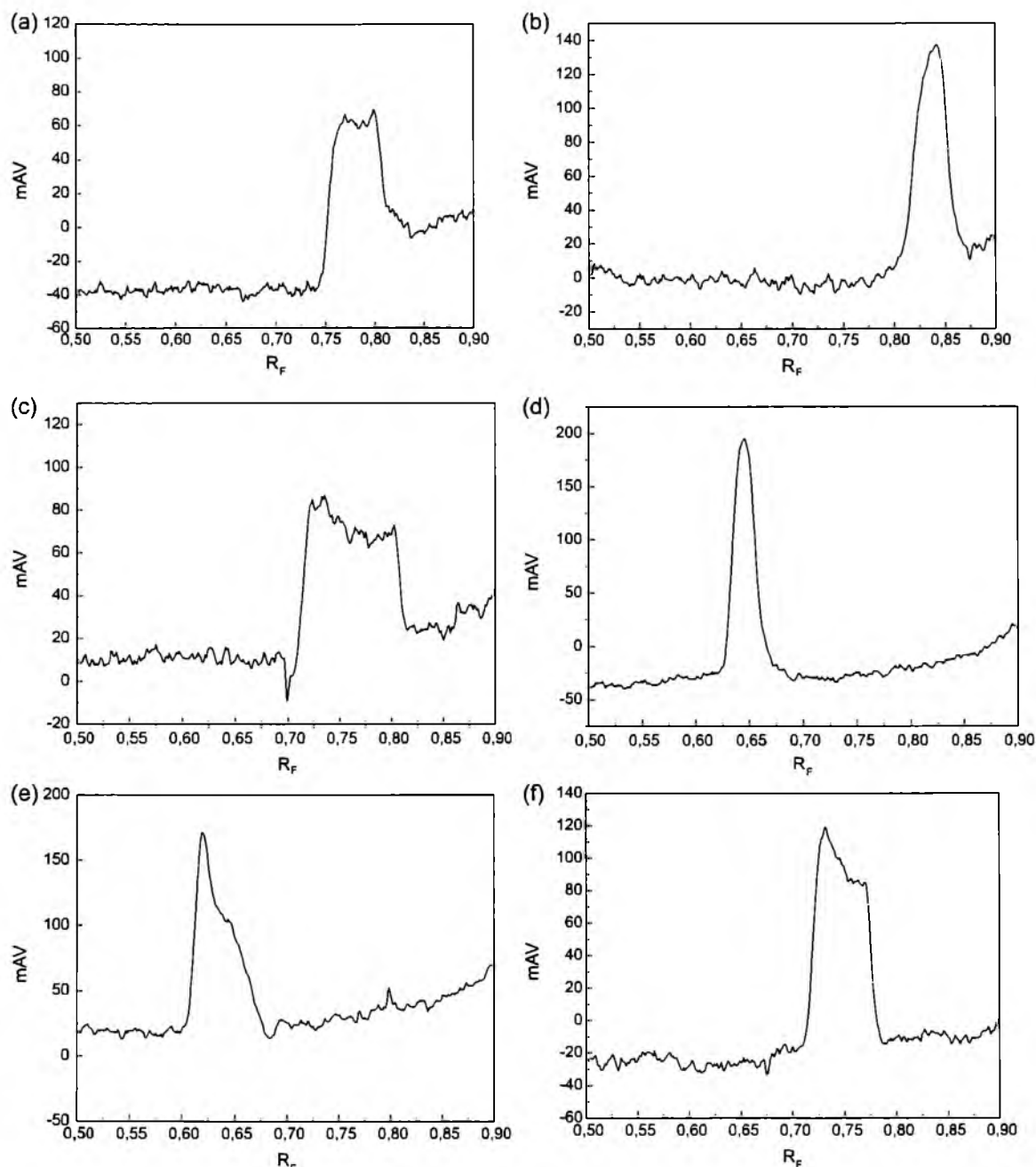


Figure 1. Sequence of densitometric concentration profiles of *S,R*(±)-2-phenylpropionic acid after: (a) 0 h (racemic mixture); (b) 22.5 h (*S*(+) form); (c) 27.5 h (racemic mixture); (d) 46.5 h (*R*(-) form); (e) 51.5 h (shift from *R*(-) form to racemic mixture); and (f) 70.5 h (racemic mixture); storage time at 22°C. Changes of the peaks' concentration profiles are accompanied by changing R_F values. Stationary phase: silica gel 60 F₂₅₄ (precoated TLC plates; Merck, Darmstadt, Germany; cat. # 1.05715) impregnated with *L*-arginine. Mobile phase: acetonitrile–methanol–water, 5:1:0.75 (v/v), containing several drops of acetic acid⁽¹⁾

However, it does not propose any realistic chemical reaction (or physical process) responsible for the oscillatory removal of the reaction template (assumed to be an H-bonded cyclic homodimer of the starting carboxylic acid). The extreme simplicity of the process summarized in Eqn (1) draws attention to the intermediate reaction product (enolate ion or enol) as the possible origin of a nonlinear process. So far, no oscillatory process involving this intermediate reaction product has been discovered.

EXPERIMENTAL RESULTS

We have recently demonstrated that the profens, amino acids, and hydroxy acids we have investigated undergo not only chiral conversion but also spontaneous condensation^[16,17]. In Reference^[16], the ability of *R*-phenylglycine and *S*-phenylglycine (dissolved in 70% aqueous ethanol) to undergo rapid, nearly instantaneous, peptidization was demonstrated by TLC and the biuret test. An analogous, though less rapid, outcome

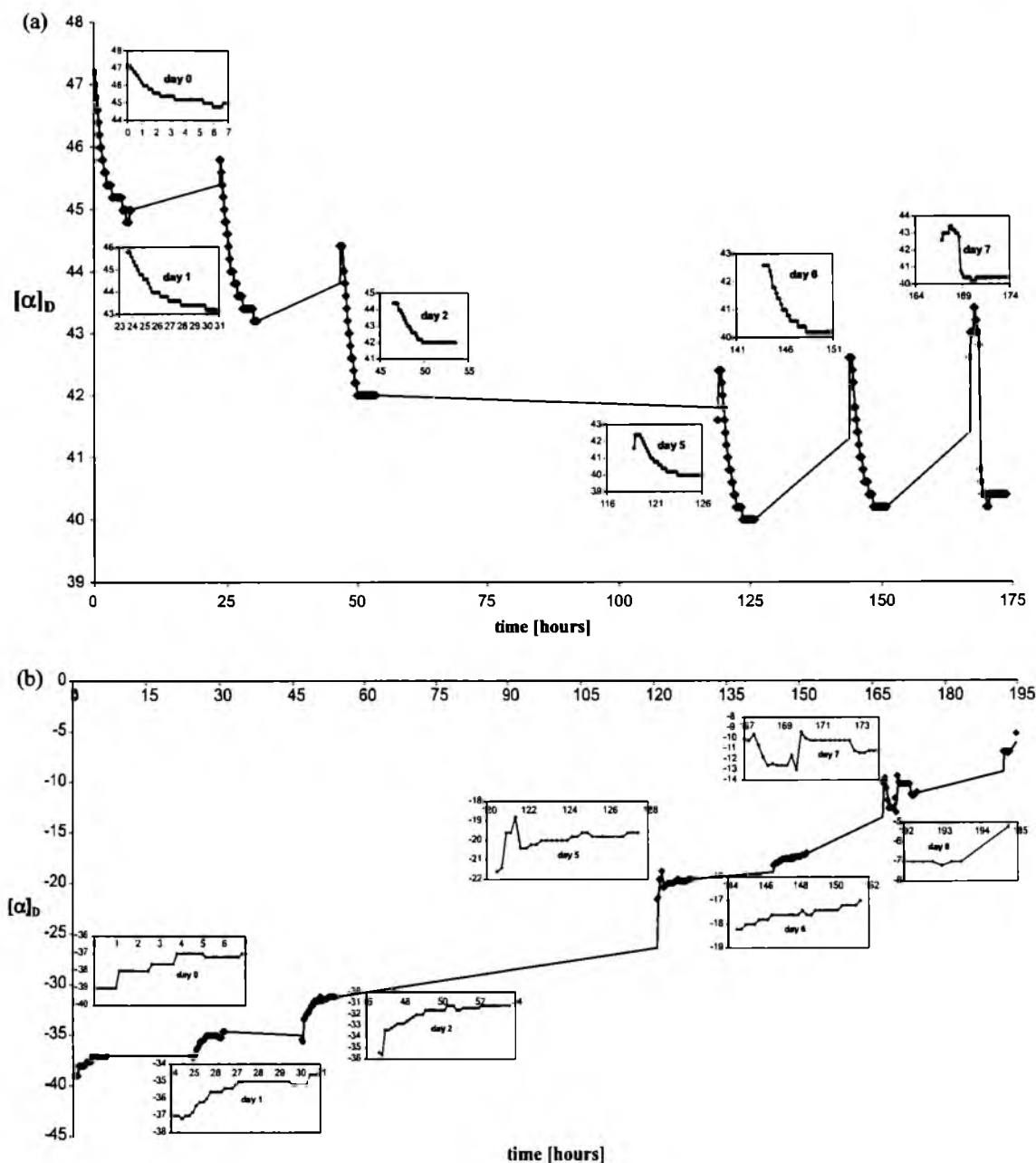


Figure 2. Oscillatory changes of the specific rotation, $[\alpha]_D$, for (a) *S*(+)-flurbiprofen and (b) *R*(-)-flurbiprofen dissolved in 70% aqueous ethanol and stored at 22°C. The general trend of the changes is indicated by the solid line, and insets show the changes on selected days of the experiment^[3]

was obtained with *L*-alanine and *L*-phenylalanine. In reference^[17], we presented experimental evidence for the spontaneous condensation of selected hydroxy acids (i.e., *L*-lactic acid and *S*(+)-mandelic acid). We have also amassed (unpublished) experimental evidence of spontaneous condensation of profens^[18]. The evidence for hydroxy acid and profen condensation originates from ^{13}C NMR spectroscopy. In Fig. 6, we present an example of ^{13}C NMR spectroscopic evidence of the spontaneous condensation of *L*-lactic acid and *S*(+)-mandelic acid, and in Fig. 7, of spontaneous condensation of *S*(+)-ketoprofen. High performance liquid chromatography (HPLC) experiments^[19] provide further support for the spontaneous condensation of

S(+)-ketoprofen. In Fig. 8, we present a sequence of chromatographic 'snapshots' showing formation and then disappearance of aging products derived from ketoprofen (most probably, ketoprofen condensates), and oscillations of the peak heights corresponding to the starting material, *S*(+)-ketoprofen, and the first condensation product. The HPLC peak heights are roughly proportional to the respective concentrations.

Summing up, storage of profens, amino acids, and hydroxy acids in aqueous organic solution results in two parallel spontaneous processes: (i) oscillatory chiral conversion and (ii) condensation. A simple scheme for such a process in profens is shown below.

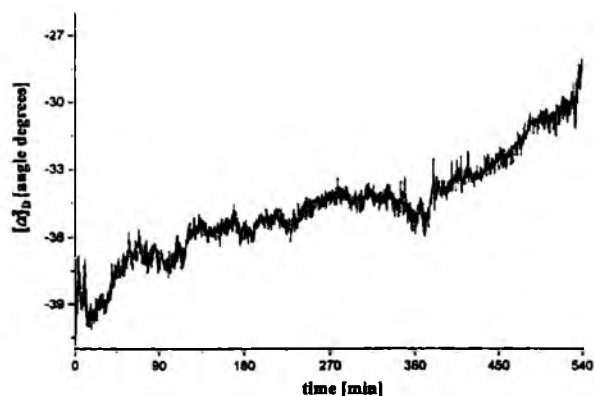
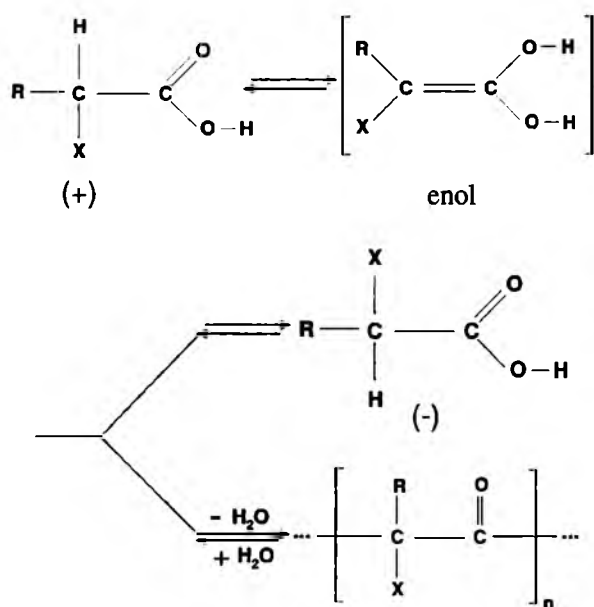


Figure 3. Oscillatory changes of the specific rotation, $[\alpha]_D$, for *R*(-)-flurbiprofen dissolved in 70% aqueous ethanol and stored at 22°C for 540 min



where $R = \text{CH}_3$, $X = \text{Ar}$.

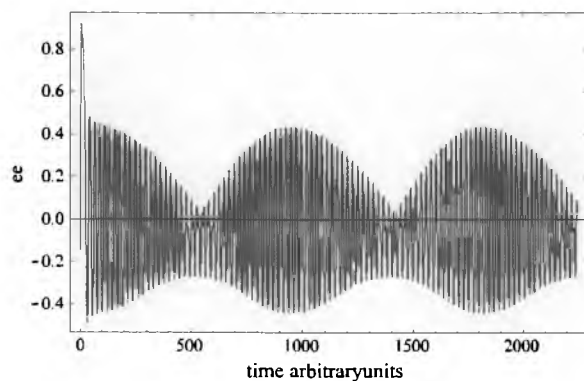


Figure 4. Complex behavior of the enantiomeric excess $ee = (a_1 - a_2 + 2b_1 - 2b_2)/(a_1 + a_2 + 2b_1 + 2b_2)$ simulated with the coupled Templator model

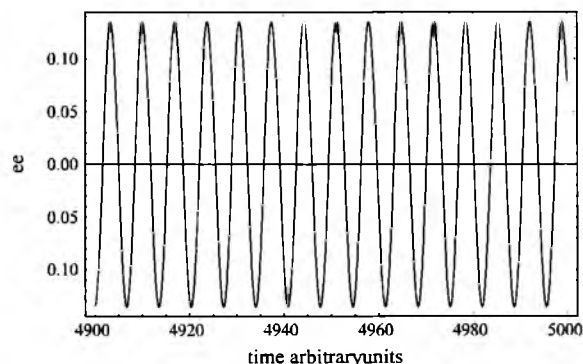


Figure 5. Enantiomeric excess $ee = ([R] - [S] + 2[R_2] - 2[S_2])/c$ for $c = 1$, $k_9 = 1$, $k_{-9} = 0.1$, $k_{10} = 1$, $k_{11} = 1$, $k_{12} = 100$, $k_{13} = 1$, simulated with Eqns (9)–(13)

DISCUSSION

With amino acids and hydroxy acids, the analogous condensation pathways are also possible, resulting, respectively, in peptidization and esterification. The kinetics of spontaneous condensation of profens, amino acids, and hydroxy acids in aqueous ethanol has not yet been studied in detail, and hence it cannot be concluded whether it is nonlinear or linear in nature. In our forthcoming studies, we will focus on the investigation of these dynamics.

In this context, it is noteworthy that oscillatory condensation has been reported in another system^[20,21]. Interestingly, the experimental evidence presented in those studies also originates

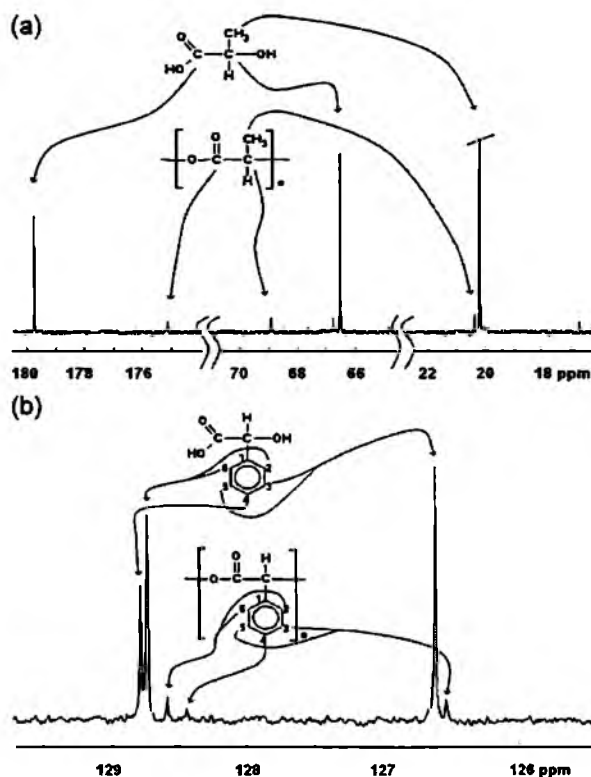


Figure 6. 100 MHz ^{13}C NMR spectra of (a) *L*(+)-lactic acid and (b) *S*(+)-mandelic acid, first dissolved and stored for 10 days in pure ethanol, and then recorded in CDCl_3 at 25°C^[16]

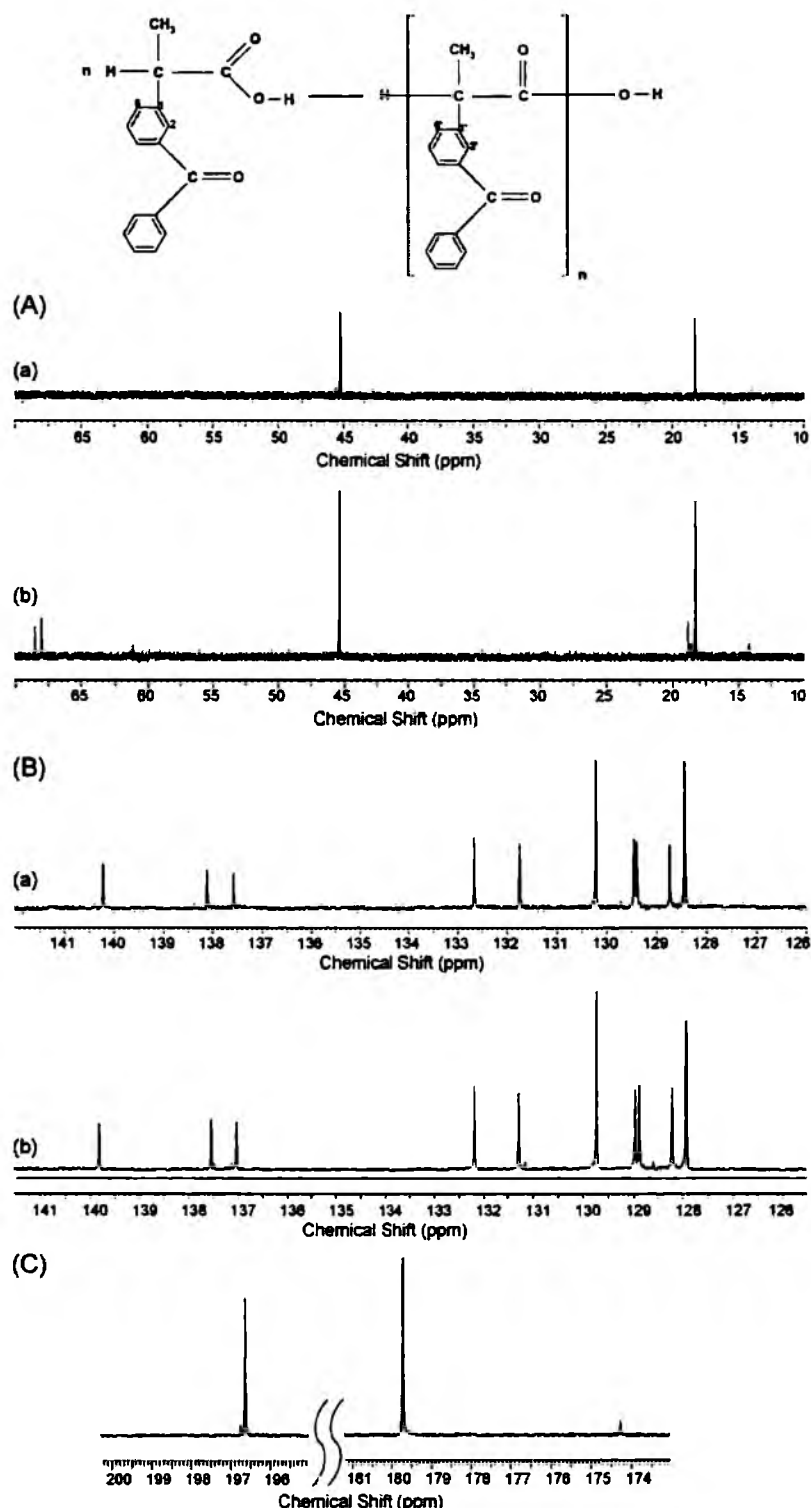


Figure 7. 100 MHz ¹³C NMR spectra of (a) *S*(+)-ketoprofen monomer and (b) *S*(+)-ketoprofen condensate. *S*(+)-Ketoprofen sample was first dissolved in pure ethanol and then stored in solution for 10 days. Spectra were recorded at 25 °C in CDCl₃. (A) Aliphatic range. Methyl line at 18.26 ppm in (a) is accompanied by two additional lines at 18.61 and 18.81 ppm in (b), which originate from the methyl groups in the repeating units of the condensate. The signal of the methine carbon at 45.31 ppm in (a) is flanked by a new small line at 45.55 in (b), coming from the end groups. The new lines at 68.03 and 68.51 ppm in (b) originate from new quaternary carbons formed in the main chain of the polymer. (B) Aromatic range. In spectrum (b) two small new peaks appear at 129.09 and 131.65 ppm, respectively, which can be attributed to C-2' and C-6', respectively, in the new molecular environment of ketoprofen condensate (as compared with spectrum (a)). (C) Carbonyl range. After 10 days storage, the carbonyl signal at 179.68 ppm in (a) is flanked by two additional lines, at 174.29 and 196.76 ppm, respectively, in (b).

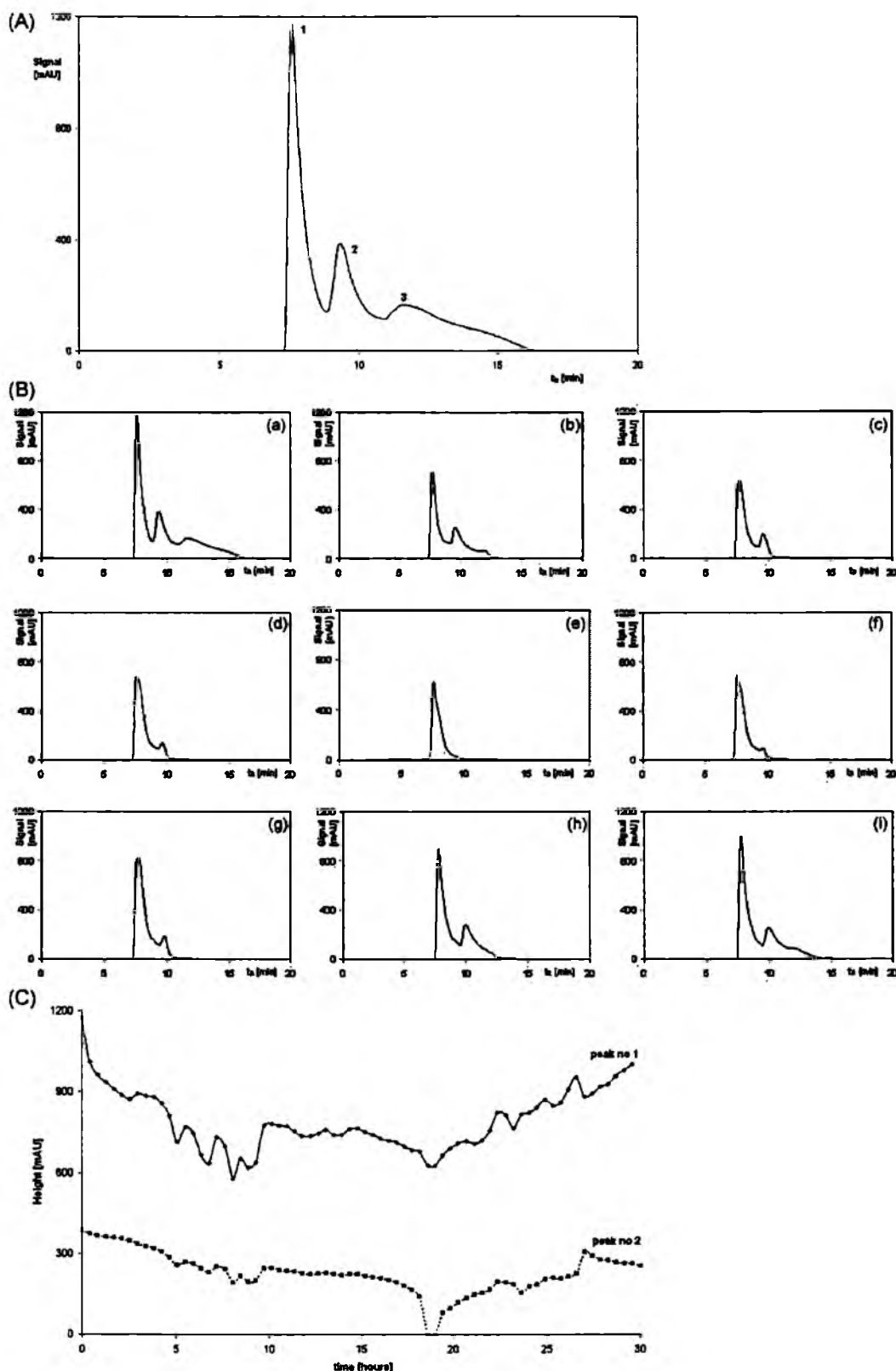


Figure 8. (A) Chromatogram of a freshly prepared solution of *S*(+)-ketoprofen in acrylonitrile recorded at 259 nm. Retention times: peak 1, 7.66 min; peak 2, 9.68 min; peak 3, 11.80 min. (B) Sequence of chromatographic concentration profiles of *S*(+)-ketoprofen dissolved in acetonitrile after (a) 0 h; (b) 5.5 h; (c) 9.5 h; (d) 18 h; (e) 19 h; (f) 20 h; (g) 24.5 h; (h) 28 h; and (i) 30 h storage time at 22 °C. (C) Time course of the chromatographic peak heights of an *S*(+)-ketoprofen solution stored at 22 °C for 30 hours. Peak numbers as in (A)^[19]

from TLC, which emphasizes the utility of this simple analytical technique in tracing the structural lability of organic compounds. Even more relevant to our own research is that the oscillatory condensation documented by these authors involves organosilanols (e.g., $R_2Si(OH)_2$ or $RR'Si(OH)_2$). There are several analogies between the results presented in references^[20,21] and those originating from our own laboratory, and also between the conclusions of the two research teams:

- (i) In selected molecular structures of the relevant organosilanols, the molecular fragment $=Si(OH)_2$ appears^[20,21]. In our study, we postulate the presence of an intermediate enol structure with the analogous molecular fragment $=C(OH)_2$ (see Eqn (1b)).
- (ii) In both studies, condensation of the respective substrates and the spontaneity of this process is well documented.
- (iii) In both cases, condensation takes place in aqueous organic solution.
- (iv) In the condensation of organosilanols, association of the monomers and oligomers is postulated as the key effect responsible for the oscillatory nature of the process. In our model of two linked Templators, the H-bonded homodimers of the carboxylic acids are suggested as templates for chiral conversion (further association of enols with these templates results in a sterically oriented structural change).
- (v) Finally, chirality seems to be a key feature in both processes. In our study, chiral carboxylic acids are the starting material, while with $RR'Si(OH)_2$ organosilanols, oligomeric condensates have asymmetric Si atoms (and the number of these atoms equals the number of coupled monomer units).

Further investigation of oscillatory processes involving simple carboxylic acids occurring spontaneously *in vitro* in abiotic aqueous organic systems seems challenging for both purely scientific reasons and also for practical ones. It seems evident that insufficient attention has so far been paid to *in vitro* studies of structurally simple compounds of high pharmaceutical and/or biochemical importance (profens, amino acids, and hydroxy acids are certainly among such compounds). As a result, processes that run spontaneously in abiotic *in vitro* systems could erroneously be attributed to *in vivo* systems only (as, e.g., in the case of *in vivo* chiral conversion of profen drugs^[22]) and then claimed to be inherent in physiological systems and biochemical processes alone. In that way, misinterpretation of natural processes can easily occur, with serious and potentially negative consequences.

Acknowledgements

This work was supported in part by National Science Foundation grant CHE-0615507 to I.R.E. The work of M.G. and D.K. was

partially supported by PhD scholarships granted to them in 2009 within the framework of the 'University as a Partner of the Economy Based on Science' (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union.

REFERENCES

- [1] M. Sajewicz, R. Piętko, A. Pieniak, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **2005**, *15*, 131–149.
- [2] M. Sajewicz, M. Gontarska, M. Wróbel, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2007**, *30*, 2193–2208.
- [3] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, Ł. Wojtal, G. Grygierczyk, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **2007**, *18*, 227–238.
- [4] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* **2008**, *21*, 43–47.
- [5] M. Sajewicz, M. Gontarska, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I. R. Epstein, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2008**, *31*, 1986–2005.
- [6] M. Sajewicz, D. Kronenbach, D. Staszek, M. Wróbel, G. Grygierczyk, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2008**, *31*, 2006–2018.
- [7] M. Sajewicz, E. John, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **2008**, *20*, 367–382.
- [8] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, M. Wróbel, R. Piętko, T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* **2009**, *22*, 241–248.
- [9] G. A. Potter, C. Garcia, R. McCague, B. Adger, A. Collet, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1666–1668.
- [10] P. Belanger, J. G. Atkinson, R. S. Stuart, *J. Chem. Soc. D-Chem. Commun.* **1969**, 1067–1068.
- [11] Y. Xie, H. Liu, J. Chen, *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 21–226.
- [12] E. Peacock-Lopez, D. B. Radov, C. S. Flesner, *Biophys. Chem.* **1997**, *65*, 171–178.
- [13] L. L. Tsai, G. R. Hutchinson, E. Peacock-Lopez, *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 2003–2006.
- [14] D. G. Blackmond, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5732–5736.
- [15] R. Plasson, H. Bersini, A. Commeyras, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16733–16738.
- [16] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **2009**, *21*, 151–160.
- [17] M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **2009**, *21*, 259–271.
- [18] M. Matlengiewicz, M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **2010**, *22*, 81–90.
- [19] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, E. Berry, T. Kowalska, Unpublished results.
- [20] P. V. Ivanov, V. I. Maslova, N. G. Bondareva, O. A. Yur'eva, N. V. Kozlova, E. A. Chernyshev, K. Yu. Odintsov, E. A. Zykunova, *Rus. Chem. Bull.* **1997**, *46*, 2138–2141.
- [21] E. A. Chernyshev, P. V. Ivanov, D. N. Golubykh, *Rus. Chem. Bull.* **2001**, *50*, 1998–2009.
- [22] V. Wsol, L. Skalova, B. Szotakova, *Curr. Drug Metab.* **2004**, *5*, 517–533.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Condensation oscillations in the peptidization of phenylglycine

Mieczysław Sajewicz¹, Monika Gontarska¹, Dorota Kronenbach¹, Marcin Leda^{2,3}, Teresa Kowalska¹, Irving R Epstein^{2*}

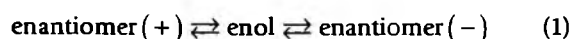
Abstract

In earlier studies, we showed that certain low-molecular-weight carboxylic acids (profens, amino acids, hydroxy acids) can undergo spontaneous *in vitro* chiral conversion accompanied by condensation to form oligomers, and we proposed two simple models to describe these processes. Here, we present the results of investigations using non-chiral high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) and mass spectrometry (MS) on the dynamics of peptidization of *S*-, *R*-, and *rac*-phenylglycine dissolved in 70% aqueous ethanol and stored for times up to one year. The experimental results demonstrate that peptidization of phenylglycine can occur in an oscillatory fashion. We also describe, and carry out simulations with, three models that capture key aspects of the oscillatory condensation and chiral conversion processes.

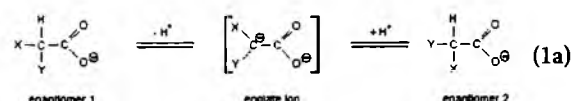
Background

The remarkable phenomenon of spontaneous *in vitro* oscillatory chiral conversion of selected profens, amino acids, and hydroxy acids has been the focus of our attention for some time. We first observed oscillatory chiral conversion in selected profens: *S*(+)-ibuprofen, *S*(+)-naproxen, *S,R*(±)-2-phenylpropionic acid, *S*(+)-flurbiprofen, *R*(-)-flurbiprofen, and *S,R*(±)-ketoprofen [1-3]. Later we described an analogous behavior in several amino acids: *L*-alanine, *L*-α-phenylalanine, and *L*-tyrosine [4-6]. We have characterized similar phenomena in selected hydroxy acids [7,8] (*L*-lactic acid, *R*-α-hydroxybutyric acid, *S*-α-hydroxybutyric acid, *R*-mandelic acid, and *S*-mandelic acid) as well. Most of these oscillatory chiral conversions take place with the acid samples dissolved in 70% aqueous ethanol.

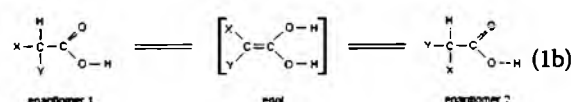
The general scheme of these chiral conversions can be simply summarized as



If we consider chiral conversion of selected carboxylic acids in aqueous solution in greater detail, then eq. (1) can be written as [9]:



In anhydrous media and in the presence of trace amounts of water, the probable mechanism of chiral conversion is given by eq. (1b) [10]:



where X = -NH₂, -OH, -Ar, etc., and Y = -R, etc.

We have suggested two simple models of oscillatory chiral conversion [11]. The simpler model [5,12] is based on autocatalytic dimerization. Oscillations appear in this model in both enantiomer subsystems. Racemization is a linear reversible reaction coupling the two oscillating subsystems. This model is based on the oscillatory Templator model of Peacock-López and collaborators [13,14].

In the second approach [15], oscillations appear as the result of coupling between enantiomers. This model appears particularly relevant for systems involving condensation or peptidization in which the condensate (dipeptide) SR has different chemical properties than RS, e.g., where only the residue on the left undergoes epimerization.

* Correspondence: epstein@brandeis.edu

²Chemistry Department, MS 015, Brandeis University, Waltham, MA 02454-9110, USA

Full list of author information is available at the end of the article

In subsequent papers [16-18], we demonstrated via the biuret test [16] and ^{13}C NMR spectroscopy [17,18] that profens, amino acids, and hydroxy acids can also undergo spontaneous condensation or peptidization when stored for sufficient time in 70% aqueous ethanol.

Ivanov et al. [19,20] have convincingly documented the oscillatory condensation of organosilanols (e.g., $\text{R}_2\text{Si}(\text{OH})_2$ or $\text{RR}'\text{Si}(\text{OH})_2$). There are several analogies between the results presented in their studies and those found in our own laboratory, which have inspired us to focus on the dynamics of condensation or peptidization of chiral low-molecular-weight carboxylic acids. For this reason, and because of the potential importance of this process in synthetic biology and chemical evolution, we have decided to focus on the issue of peptidization of amino acids coupled to their oscillatory chiral conversion [16]. More specifically, we scrutinize here the dynamics of peptidization of the low-molecular-weight amino acids, *R*-, *S*-, and *rac*-phenylglycine. The primary analytical tool that we employ to monitor the spontaneous peptidization of phenylglycine samples dissolved in 70% aqueous ethanol is a non-chiral high-performance liquid chromatographic system with diode-array detection (HPLC-DAD). We also supplement this technique with mass spectrometry (MS). In addition, we propose three models that go beyond the schemes developed earlier [11] to capture key aspects of the condensation and oscillatory chiral conversion processes.

We note that Blackmond [21] has suggested a mechanism involving preferential catalysis by homo-chiral dimers to explain enantiomeric amplification in the Soai reaction, the autocatalytic alkylation of *N*-heterocyclic aldehydes by zinc dialkyls. Mickskei et al. [22] subsequently extended this idea to a detailed model and showed in numerical simulations that enantiomeric enrichment and oscillation can occur under appropriate conditions.

Experimental

Reagents

R-Phenylglycine and *S*-phenylglycine of analytical purity grade were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Phenylglycine racemate was prepared by mixing optically pure *R* and *S* antimers in molar proportions of 1:1. For the spontaneous peptidization experiments, we used solutions of *R*-phenylglycine, *S*-phenylglycine, and *rac*-phenylglycine in 70% aqueous ethanol. The concentration of each optically pure enantiomer was 0.5 g L^{-1} ($3.3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). The racemic mixture contained each antimer at half the above concentration. Samples were stored in tightly stoppered colourless glass vials and allowed to age at 22°C. We also prepared analogous solutions of *R*-phenylglycine,

S-phenylglycine, and *rac*-phenylglycine that were stored for one year at 22°C.

HPLC-DAD

High performance liquid chromatographic analysis was carried out using a Gyncotek liquid chromatograph (Gyncotek, Macclesfield, UK) equipped with a Gyncotek Gina 50 model autosampler, Gyncotek P 580A LPG model pump, Gyncotek DAD UVD 340U model diode array detector, and Chromeleon Dionex v. 6.4 software for data acquisition and processing. The analyses were carried out in the isocratic mode, using an RP-18 ($5 \mu\text{m}$ particle size) column ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$; Varian, Harbor City, CA, USA), and methanol-water (6:4, *v/v*) mobile phase at a flow rate of 0.6 mL min^{-1} . The chromatographic column was thermostated at 35°C with a Varian Pro Star 510 model column oven.

Mass Spectrometric Analysis

Freshly prepared and aged phenylglycine samples were introduced into a Varian 500-MS model mass spectrometer and analyzed in the ESI mode (full ESI-MS scan, positive ionization, spray chamber temperature 45°C, drying gas temperature 150°C, drying gas pressure 25 psi, capillary voltage 70 V, needle voltage 5 kV). A Varian MS Workstation v. 6.9.1 software was used for data acquisition and processing.

Microbiological Tests

We tested for the presence of microorganisms in samples of *R*- and *S*-phenylglycine aged for one year using solid and liquid media. Composition of solid medium: meat extract, 2 g L^{-1} ; yeast extract, 2 g L^{-1} ; peptone, 5 g L^{-1} ; sodium chloride, 4 g L^{-1} ; agar, 15 g L^{-1} , pH = 7.4. Composition of liquid medium: meat extract, 0.4 g L^{-1} ; enzymatic casein hydrolysate, 5.4 g L^{-1} ; yeast hydrolysate, 1.7 g L^{-1} ; peptone, 4.0 g L^{-1} ; sodium chloride, 3.5 g L^{-1} .

With the solid medium, 100- μL aliquots of the samples to be tested were introduced and incubated for seven days at approximately the same temperature (*ca.* 21°C) at which the samples had been stored earlier. This experiment was repeated in triplicate. To 50 mL of the liquid medium, we added 100- μL aliquots and then incubated the samples for fourteen days at ambient temperature (*ca.* 21°C) with continuous shaking (260 rpm). This experiment was also repeated in triplicate. In none of the samples was growth of microorganisms observed. Longer incubation periods were not employed, due to the risk of sample infection.

As a control, we carried out a protein determination by the Bradford method [23] and also measured the light absorbance at $\lambda = 260 \text{ nm}$ in order to check for the presence of DNA in the two samples. The Bradford

test gave a negative result, and the spectrophotometric measurement revealed no DNA in our samples. We therefore concluded that no microorganisms were present.

Results and Discussion

S-Phenylglycine

In Fig. 1 we present two mass spectra of *S*-phenylglycine, the first of a freshly prepared solution in 70% aqueous ethanol and the second of an analogous sample after a one-year storage period. Both spectra were recorded for the total samples, i.e., without any preliminary separation by LC-MS.

Considered as fingerprints, the two mass spectra shown in Fig. 1 are quite different. It is evident that fragmentation of the aged sample (Fig. 1b) results in a

much richer pattern than that of the freshly prepared one (Fig. 1a). The aged sample apparently contains a wider variety of species. In the fresh sample, the predominant ion appears at m/z 304, which can be ascribed to the $[\text{Phg}_2 + \text{He}]^+$ cation (where Phg_2 represents the cyclic associative dimer composed of two phenylglycine molecules coupled by a pair of hydrogen bonds), whereas in the aged sample the same cation makes a relatively small contribution to the recorded fingerprint. The disappearance of this cation supports the notion that the aged sample contains new species originating from *S*-phenylglycine. We note that a second cation (at $m/z = 289$) appears in both spectra. This signal can be attributed to $[\text{Phg}_2 - \text{NH} + \text{He}]^+$, and in the aged sample it apparently predominates. As this ion, which also seems to be associated with the phenylglycine dimer,

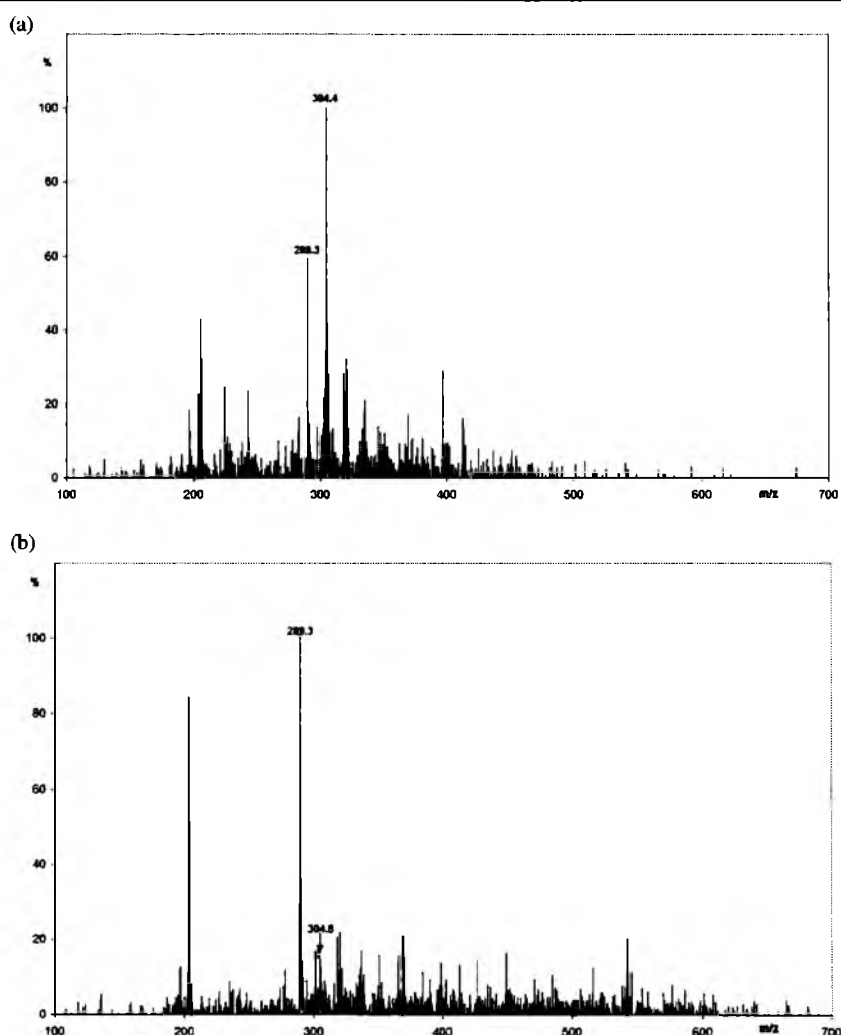


Figure 1 Mass spectra of *S*-phenylglycine solution in 70% aqueous ethanol; (a) freshly prepared sample, and (b) sample after one year storage period. Both samples were stored at 22°C.

still predominates in the sample stored for one year, we conclude that structural transformation due to aging consumes a relatively small portion of the starting material.

The aging of *S*-phenylglycine dissolved in 70% aqueous ethanol is also mirrored in the respective chromatograms. Based on the results of biuret test [16], it seems that oligopeptides are the most probable outcome of this process. We compare the chromatograms of the freshly prepared *S*-phenylglycine solution with those stored for nine days and for one year (Fig. 2a-c).

In the HPLC experiment, we employ a non-chiral chromatographic system and focus on monitoring the appearance and/or concentration changes of species that evolve during the *S*-phenylglycine aging process. Peaks 1 and 2, which are present in all the samples, with retention times, t_R , of 5.2 and 5.4 min, respectively, can probably be attributed to phenylglycine in two different associative forms. We make this assertion because a) the two peaks appear at similar retention times, suggesting similar chemical properties; b) they predominate in the freshly prepared sample; and c) their intensities decrease with time. The mass spectrometric evidence of two species apparently derived from phenylglycine at m/z 289 and 304, which we ascribed earlier to the $[\text{Phg}_2 - \text{NH} + \text{He}]^+$ and $[\text{Phg}_2 + \text{He}]^+$ cations, respectively, also supports our identification. A key feature, seen in the mass spectra shown in Fig. 1, is that the peaks evolve at different rates, which supports our hypothesis that *S*-phenylglycine appears in the system in two different associative forms.

We attribute the peaks with higher retention times to larger oligopeptides generated in the course of the sample aging. The results of the biuret test performed with *S*-, *R*-, and *rac*-phenylglycine [16] also indicate the presence of oligopeptides in aged samples.

In Fig. 3, we present chromatograms of a freshly prepared *S*-phenylglycine solution and one stored for a year. The aim of this comparison is to emphasize the differences at higher retention times, where the higher oligopeptides (which are not abundant enough to be seen in the nine-day sample) are likely to be found.

Figure 3, and the absence of long retention time peaks after nine days, demonstrate that the accumulation of higher oligopeptides is a relatively slow process that may take months to yield measurable amounts of these condensation products. In the insets of Fig. 3b, we examine the peaks corresponding to the three species with the highest retention times in more detail. The different shapes of the UV spectra at different wavelengths and the observed bathochromic shifts support our

association of longer retention times with more monomer units in the oligopeptide.

One goal of this study is to establish if the condensation products, i.e., oligopeptides, in an *S*-phenylglycine solution arise in a monotonic or an oscillatory manner. To investigate this question, we monitored chromatographic peak heights in an aging sample, as registered at 275 nm. These peak heights are roughly proportional to the concentrations of the respective chemical species. In Fig. 4, we present the time courses of peaks 1-5, numbered as in Fig. 2.

Clearly, the peak heights change in a non-monotonic fashion. The linear correlation coefficients r for calibration curves determined from the peak heights for stable reference compounds using the same chromatographic conditions (HPLC-DAD system, chromatographic column and mobile phase composition) and at least ten data points always exceeded $r \geq 0.99$. Moreover, the percent error on each individual peak height never surpassed $\pm 5\%$. Thus, the trends of the peak height changes in Figs. 4a, b seem to confirm the oscillatory nature of the condensation process, though the limited time resolution precludes our establishing whether the reaction is truly periodic.

The height of peak 1 initially rises in an erratic manner. This growth may arise from hydrolysis of trace amounts of oligopeptide impurities present in the commercial sample and visible in the chromatogram in Fig. 2a. After ca. 110 h, the mean abundance of peak 1 starts to decrease in an oscillatory fashion, which can be ascribed to consumption of the starting amino acid through peptidization. This effect correlates with the time-dependent fall of the intensity of peak 1 seen in Figs 2a-c.

The mean intensity of peak 2 grows during the nine day observation period. Again, this behavior may result from hydrolysis of trace oligopeptide impurities or perhaps from interconversion of the two types of H-bonded phenylglycine dimers represented by peaks 1 and 2. Although the intensity of peak 2 increases during this initial nine-day period (see Figs 2a, b), after one year the intensity of peak 2 becomes almost negligible (see Fig. 2c). This eventual lowering of the intensity of peak 2 may correspond to the consumption of the phenylglycine through peptidization.

Peaks 3-5 can be attributed to oligopeptides initially present in our samples. During the nine days of our experiment, the general trend in the height of peaks 3 and 5 is oscillatory yet growing, while peak 4 is nonmonotonically diminishing. The long-term history of peaks 3-5 confirms a slow concentration growth of the respective oligopeptides (see Figs 2a-c).

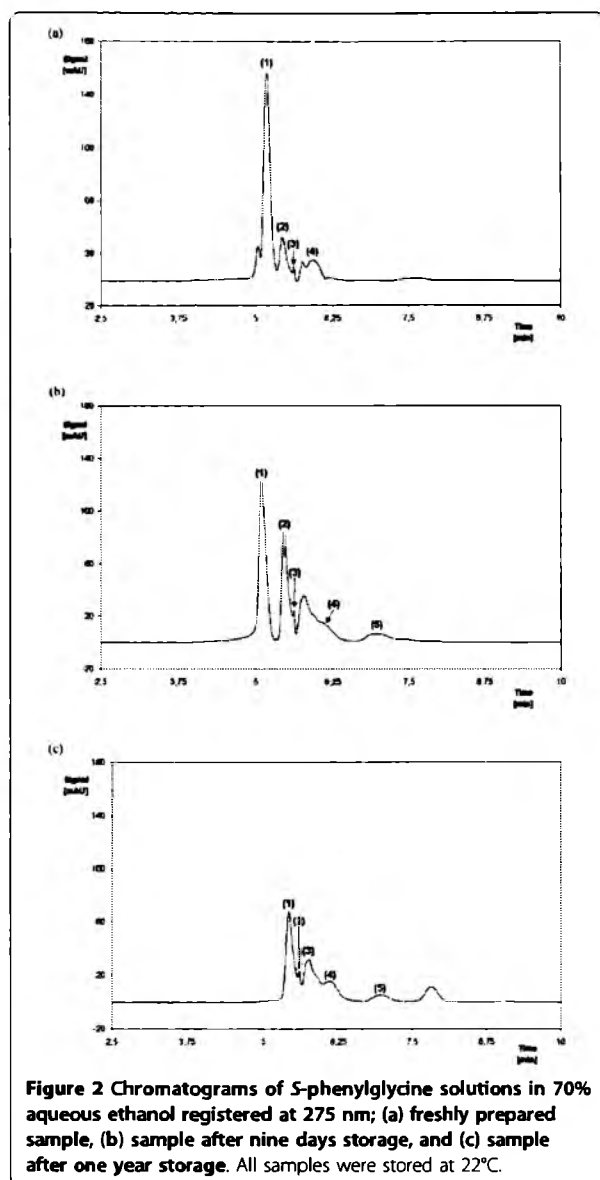


Figure 2 Chromatograms of *S*-phenylglycine solutions in 70% aqueous ethanol registered at 275 nm; (a) freshly prepared sample, (b) sample after nine days storage, and (c) sample after one year storage. All samples were stored at 22°C.

The results presented in Fig. 4 support the oscillatory nature of *S*-phenylglycine peptidization. This oscillatory process can be schematically described by the following equations:



R-Phenylglycine and *rac*-Phenylglycine

We repeated our experimental protocol with samples of *R*-phenylglycine and *rac*-phenylglycine, recording mass spectra for freshly prepared solutions in 70% aqueous ethanol and for the analogous samples after a one year storage period. All spectra were recorded for the total samples, i.e., without preliminary separation and identification of any of the aging products by LC-MS. The results obtained are shown in Figs. 5 and 6.

As with the *S*-enantiomer, the mass spectrometric fingerprints of the freshly prepared and aged *R*- and *rac*-phenylglycine samples differ considerably. Again, both samples show peaks at *m/z* 289 and 301, which we attribute to two different dimeric forms of the starting material. Again, the relative intensities of these two signals change in the course of aging so that in the freshly prepared samples the peak at *m/z* 289 is lower than that of the heavier ion, while after one year the reverse proportion is observed.

The mass spectra of the aged *R*- and *rac*-phenylglycine samples (Figs. 5b and 6b) differ, however, in important ways from that of the aged *S* species (Fig. 1b). In the latter case, we find a much richer array of signals originating from heavier ions than in the mass spectrum of the freshly prepared sample (see Fig. 1b vs. 1a). In the first two cases, the spectrum of the aged solution contains fewer, better separated signals at *m/z* values above those attributed to the H-bonded dimers than in the starting solution. In the aged *R*-phenylglycine sample, for example, two such signals are perceptible at *m/z* 413 and 582 (Fig. 5b). The mass values suggest that all these signals might originate, e.g., from the fragmented tetrapeptide. The analogous signals found in the aged *rac*-phenylglycine sample appear at *m/z* 369, 413, and 542 (Fig. 6b) and hence an analogous conclusion as to a possible tetrapeptide origin can be drawn.

We also monitored the aging process with *R*-phenylglycine and *rac*-phenylglycine by means of HPLC-DAD using the same techniques we applied to *S*-phenylglycine. In qualitative terms, the behavior of all three sets of samples was very similar. Again, we observed the two peaks (1 and 2) at retention times (*t_R*) of 5.2 and 5.4 min, respectively, which we ascribe to pure *R*- and *rac*-phenylglycine in the two different associative forms. However, more detailed scrutiny of the respective chromatograms reveals quantitative differences that point toward a different dynamics of aging, i.e., of peptidization, in each of the three samples. A comparison of the respective chromatograms is given in Fig. 7.

Figure 7a demonstrates that the intensities of peaks 1 and 2 differ among the three samples after seven days of aging. These intensities and their ratios are, respectively,

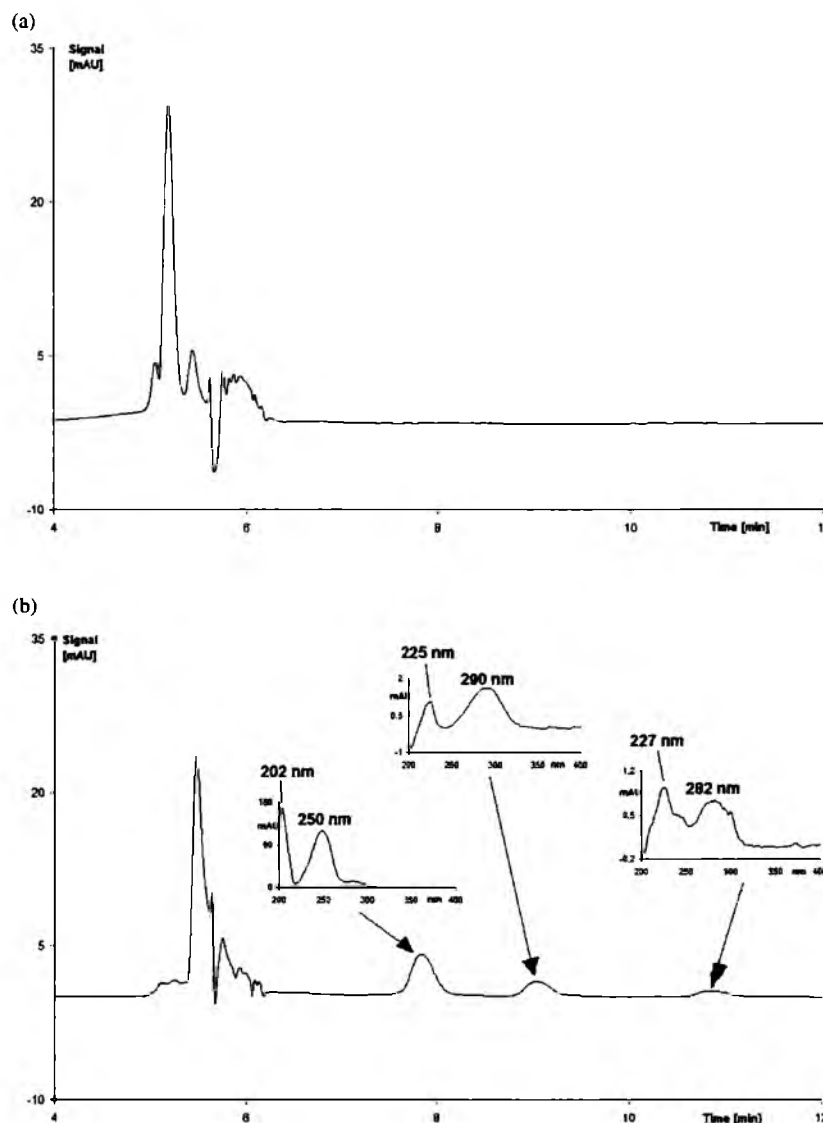


Figure 3 Chromatograms of an *S*-phenylglycine solution in 70% aqueous ethanol registered at 300 nm. (a) freshly prepared sample; (b) sample after one year. Insets in (b) show UV spectra of the separated species recorded near the maxima of the respective peaks.

112 and 75 mAV (1.49:1), 97 and 54 mAV (1.80:1), and 81 and 29 mAV (2.79:1) for *S*-phenylglycine, *R*-phenylglycine, and *rac*-phenylglycine, respectively. We find that the lowest concentrations of species 1 and 2, and hence the highest peptidization rate, occur in the case of the racemic mixture. This observation is in good agreement with the results of biuret test [16] performed on three different phenylglycine samples after a storage period of a few days, which also pointed to *rac*-phenylglycine as the sample with the highest peptidization yields.

The chromatograms obtained after a one year storage period (Fig. 7b) present a somewhat different picture.

The intensities of peaks 1 and 2 and their ratios with *S*-phenylglycine, *R*-phenylglycine, and *rac*-phenylglycine, respectively, are now 65 and 11 mAV (ratio 5.91), 155 and 50 mAV (3.10), and 169 and 19 mAV (8.63). Clearly, the long term dynamics differ from what was observed after seven days. To highlight the differences in the long term peptidization process with the three samples, in Fig. 8 we expand the chromatograms shown in Fig. 7b in the 6-12 min retention time range.

Figure 8 demonstrates that after one year higher molecular weight products, presumably oligopeptides, which cannot be detected during the short term storage period, appear. The peak numbering corresponds to that used in

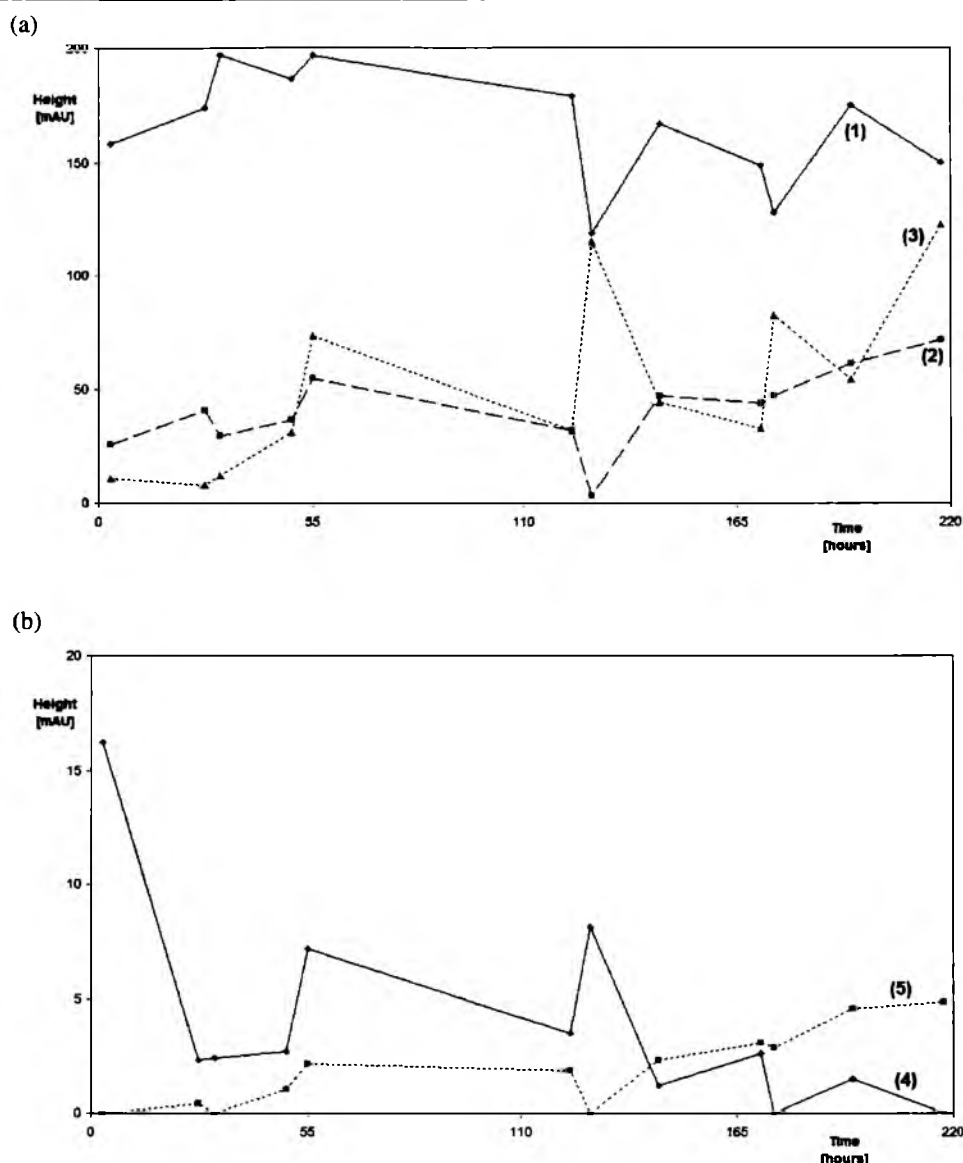


Figure 4 Chromatographic peak heights for (a) peaks 1-3, and (b) peaks 4 and 5 for an S-phenylglycine solution stored at 22°C for nine days. Peak numbers as in Fig. 2. Retention times: peak 1, 5.2 min; peak 2, 5.4 min; peak 3, 5.6 min; peak 4, 6.0 min; peak 5, 6.9 min.

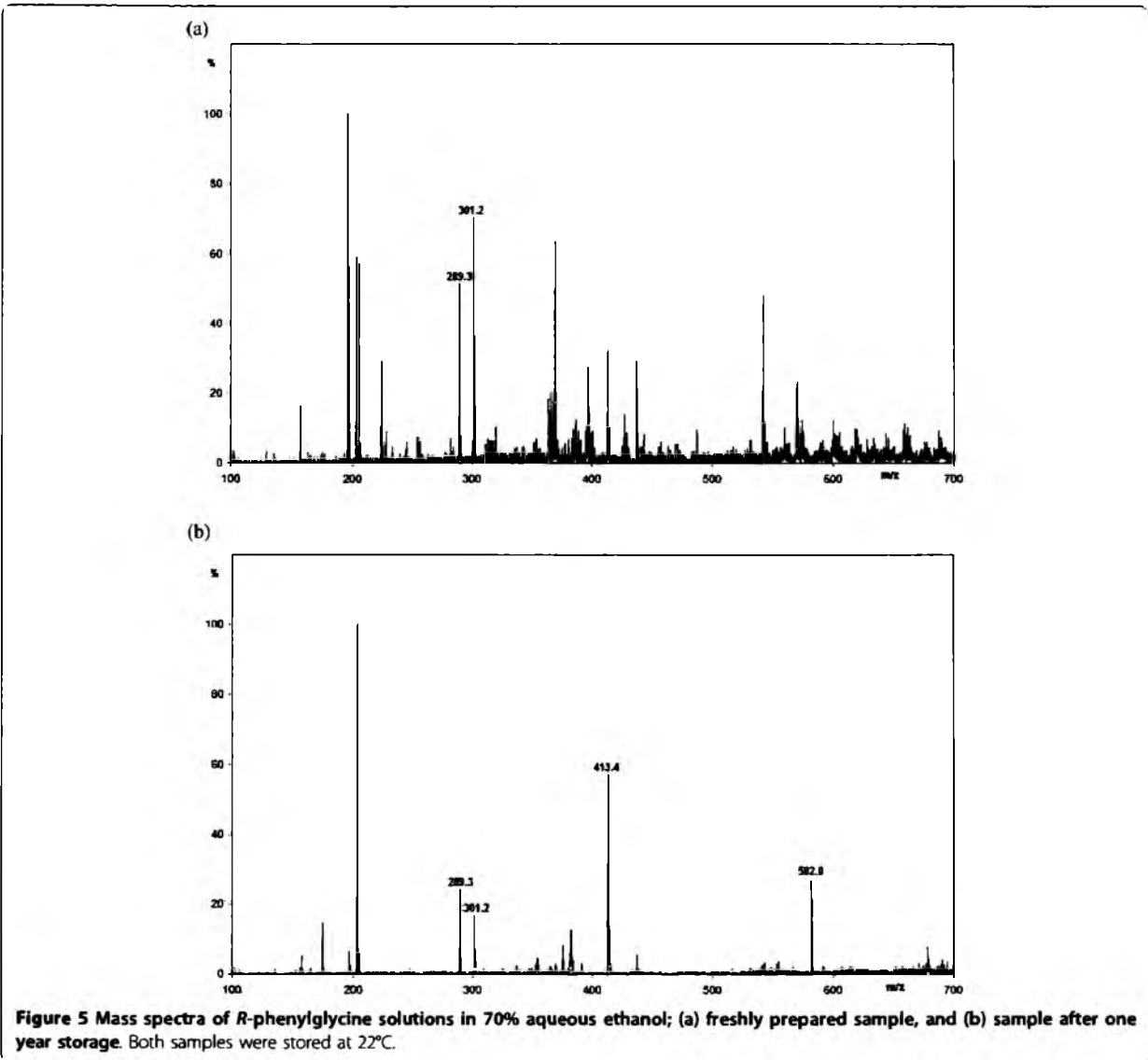
Fig. 2, but we now see the additional aging products numbered 6 to 9. Each one year old sample yields different amounts of the respective products, and in the aged R-phenylglycine sample peaks 4 and 5 are no longer visible.

Since a major focus of this study is on establishing whether the peptidization process is monotonic or oscillatory, we used the HPLC data to follow the concentrations of the various species originating from R-phenylglycine and rac-phenylglycine in time. The results for peak heights 1-5, which should be roughly proportional to the concentrations of the corresponding species

are shown for R-phenylglycine and rac-phenylglycine in Figs. 9 and 10, respectively. Although the long times between measurements make it difficult to obtain a characteristic frequency of oscillation, it is clear that the behavior is not monotonic.

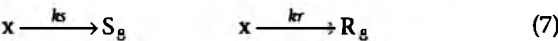
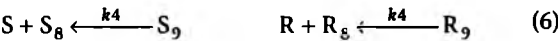
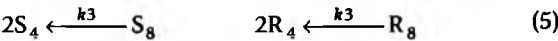
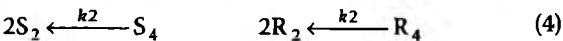
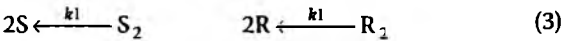
Theoretical Models

We present here three models derived from existing schemes in the literature that capture the key features of the processes studied here: chiral conversion and condensation occurring in an oscillatory fashion.

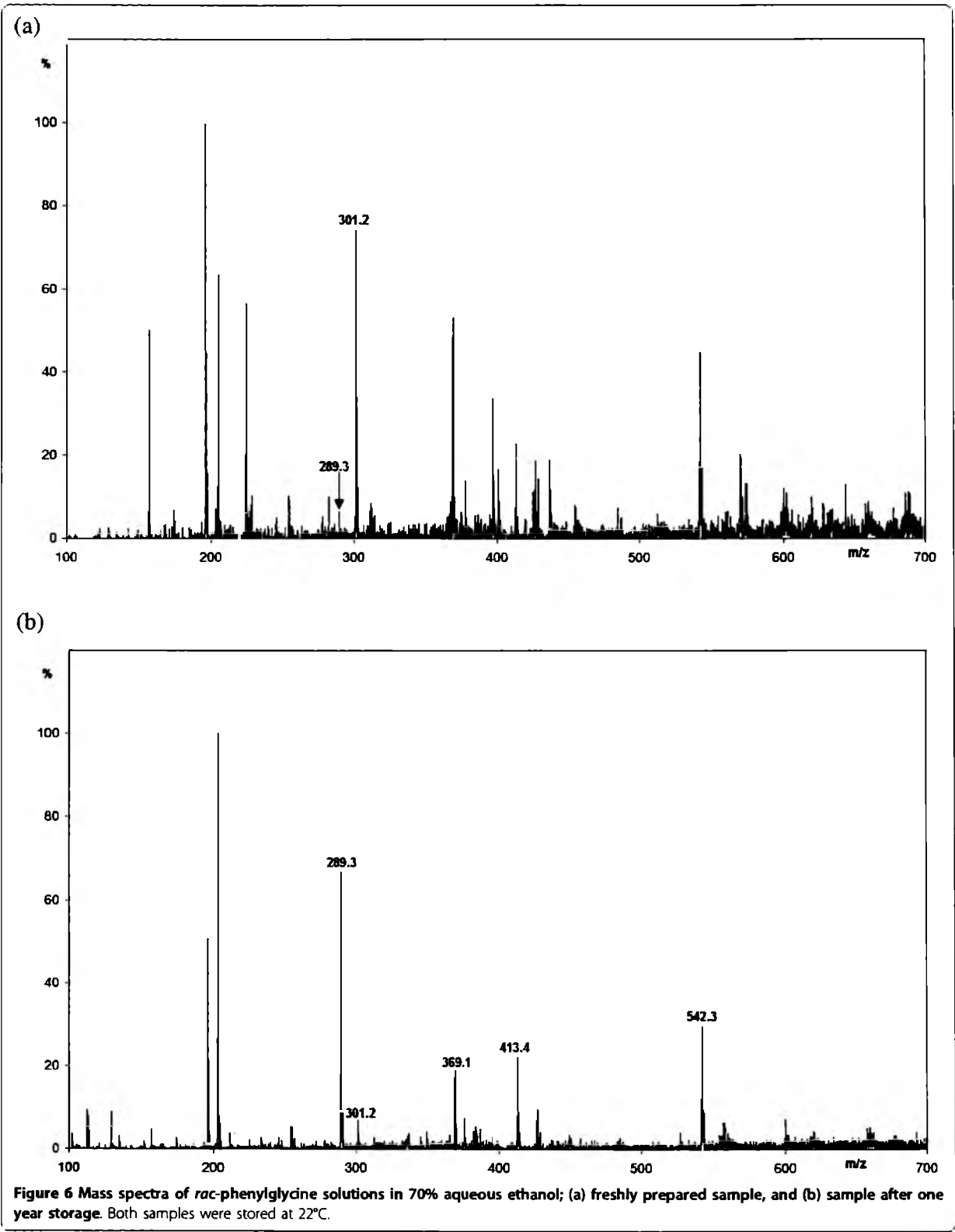


Model 1

We wish to describe a chiral system in which association can occur. Suppose that enantiomeric monomers S and R can form dimers (S_2 , R_2), trimers and higher oligomers (S_i , R_i $i = 4, \dots$). Including all possible association and dissociation reactions generates a very complicated network, but it is possible to choose a subsystem that gives temporal oscillation. One such possibility (for an achiral system) has been proposed by Hyver [24], and we modify his scheme to include chirality.



Reaction (8) represents racemization, which is assumed to be first order and slow with respect to the other reactions. This scheme contains no autocatalytic



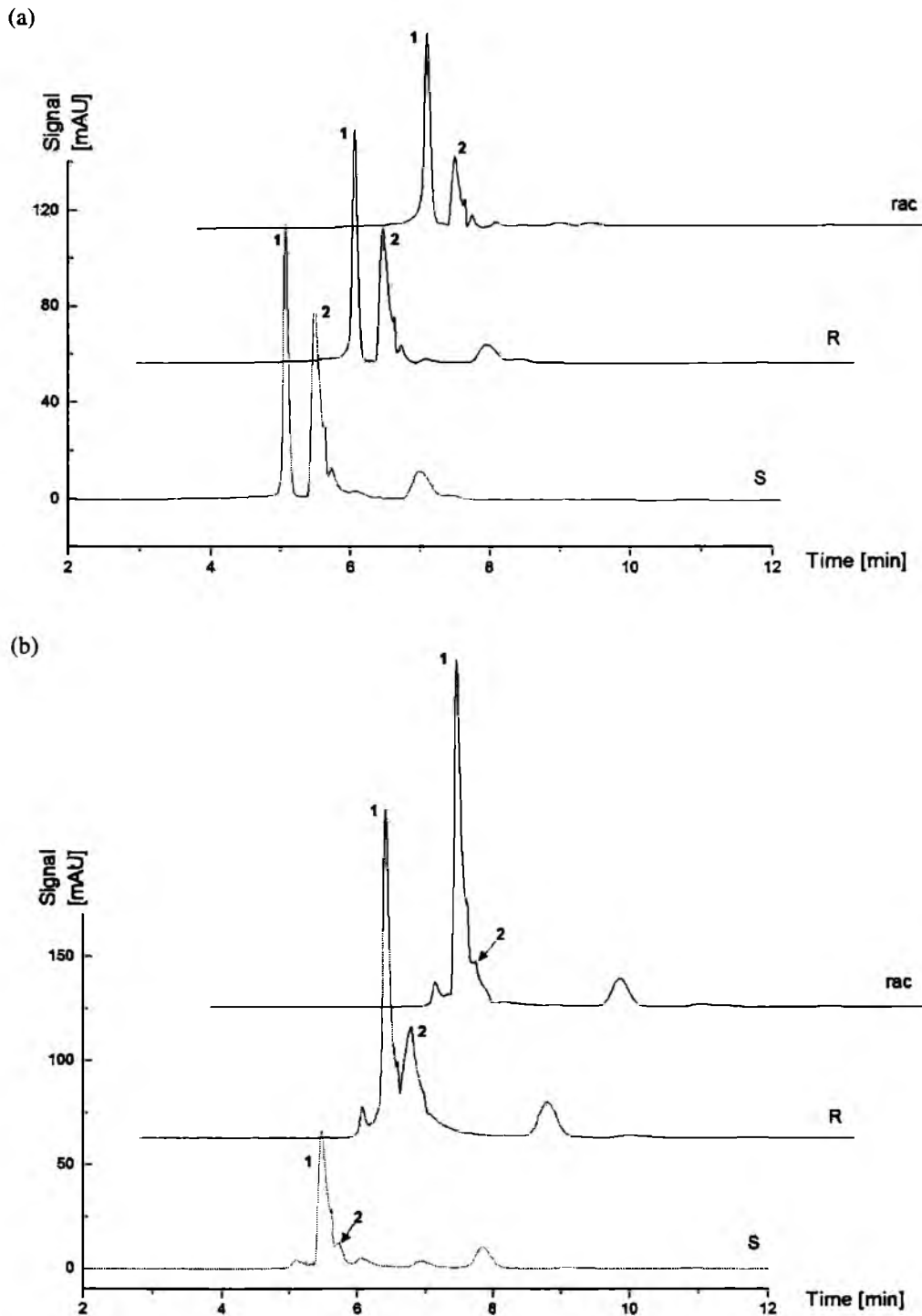
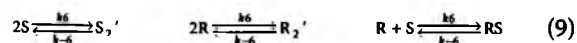


Figure 7 Chromatograms of *S*-phenylglycine, *R*-phenylglycine, and *rac*-phenylglycine solutions in 70% aqueous ethanol registered at 275 nm; (a) each sample after seven days storage; (b) each sample after one year storage. All samples were stored at 22°C.

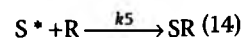
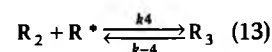
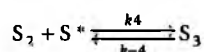
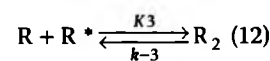
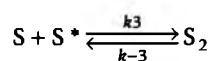
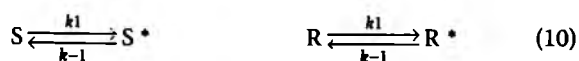
steps. The system is open by virtue of the pool of higher oligomers (X), which dissociate to create lower oligomers. This pool of oligomers need not contain equal amounts of enantiomers, so the rate constants k_r and k_s can be different. To take into account the condensation of monomers, we add to Hyver's scheme the additional steps



where S_2' , R_2' and RS denote condensates of enantiomers S and R . We assume that reactions involving condensates (9) are much slower than dissociations (3-7). As Fig. 11 shows, oscillations are easily obtained in such a model.

Model 2

In an alternative approach, the condensation step itself can be the source of nonlinearity. In the model shown below [25] formation of activated monomers S^* and R^* occurs autocatalytically (reaction 11).



This scheme is closed with respect to mass exchange, i.e., the total concentration of monomers $c = [S] + [S^*] + 2[S_2] + 3[S_3] + [R] + [R^*] + 2[R_2] + 3[R_3]$ is constant.

The dimer and trimer concentrations in Fig. 12 oscillate with small amplitude. In such a system, it is likely that only oscillations in the monomer concentrations would be observable.

Model 3

In our final model, oscillations appear as result of coupling between enantiomers[15]. This model is especially

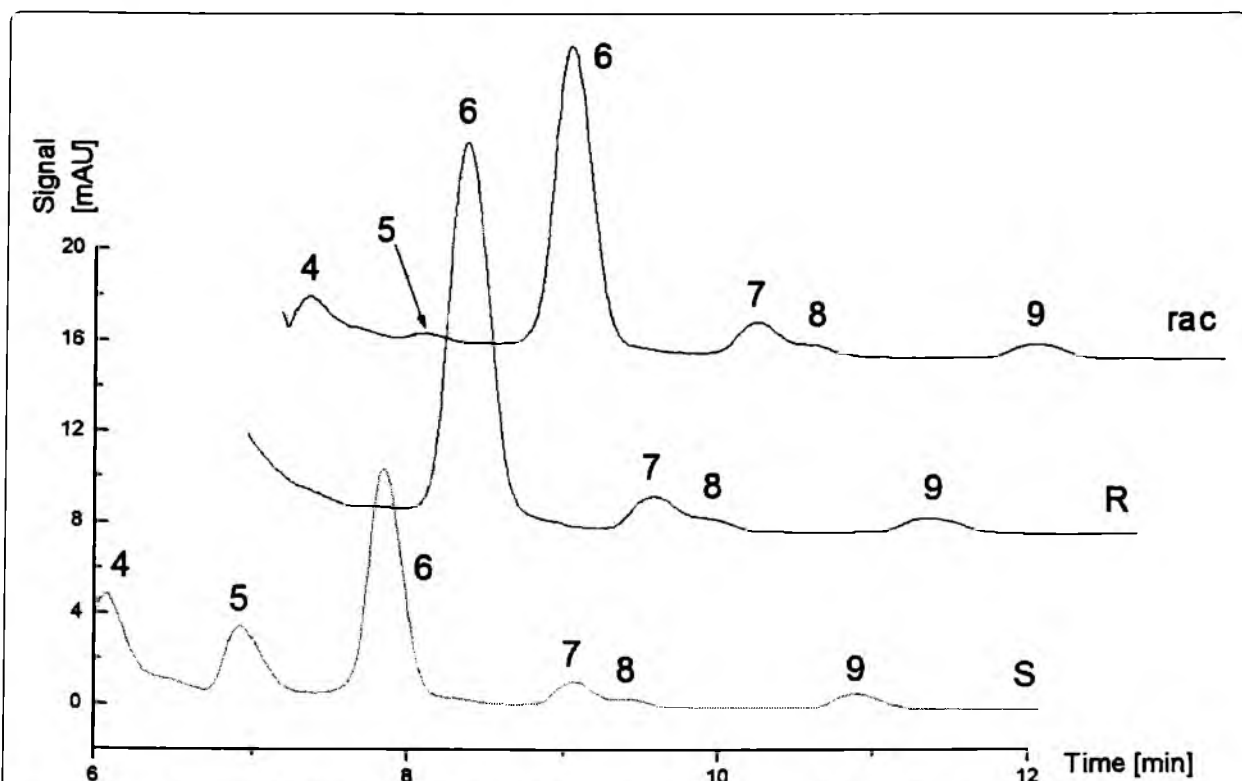
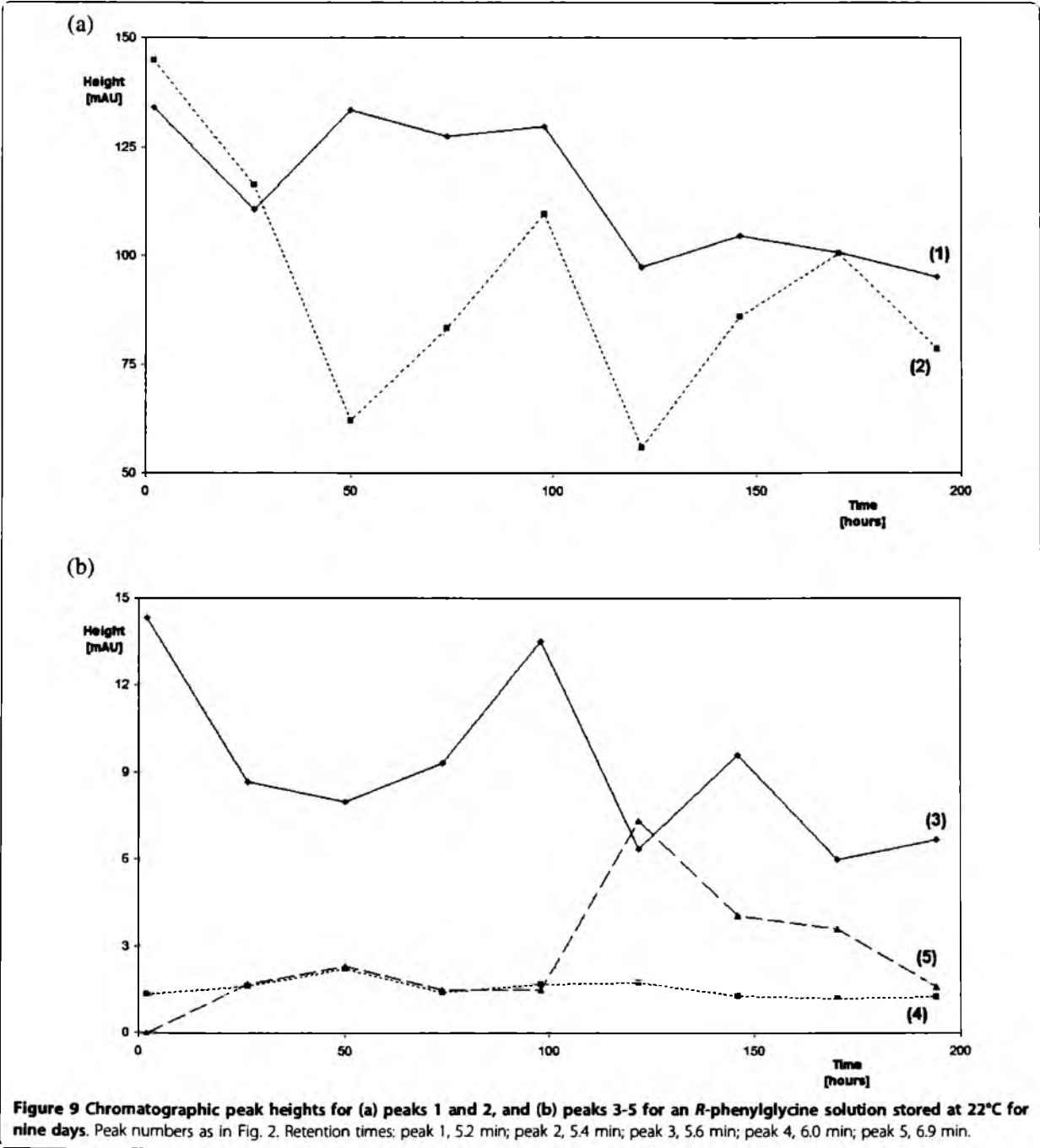


Figure 8 Chromatograms of S-phenylglycine, R-phenylglycine, and rac-phenylglycine solutions in 70% aqueous ethanol at 275 nm.



appropriate for systems in which the condensate SR has different chemical properties than RS.



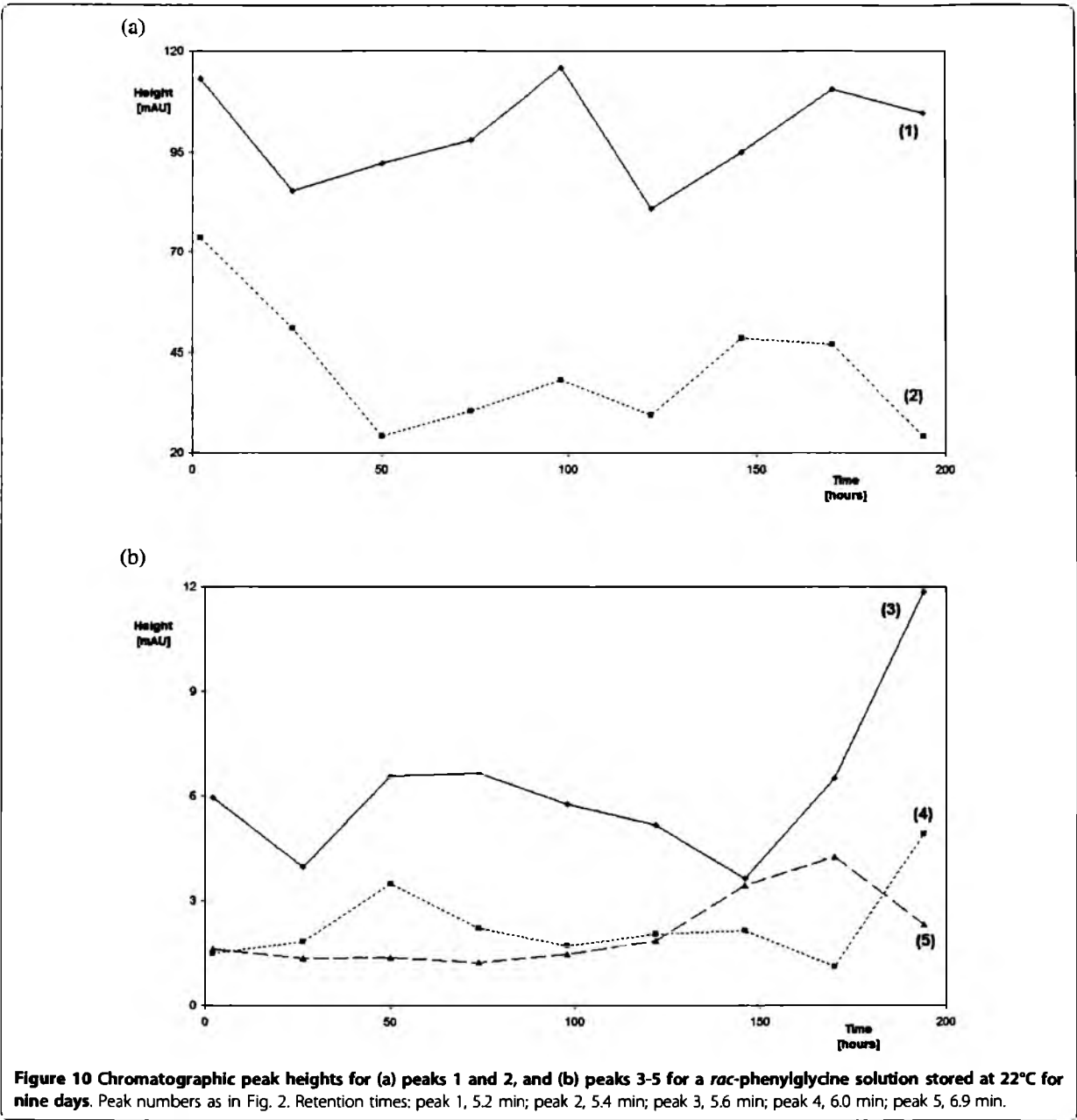


Figure 10 Chromatographic peak heights for (a) peaks 1 and 2, and (b) peaks 3-5 for a *rac*-phenylglycine solution stored at 22°C for nine days. Peak numbers as in Fig. 2. Retention times: peak 1, 5.2 min; peak 2, 5.4 min; peak 3, 5.6 min; peak 4, 6.0 min; peak 5, 6.9 min.



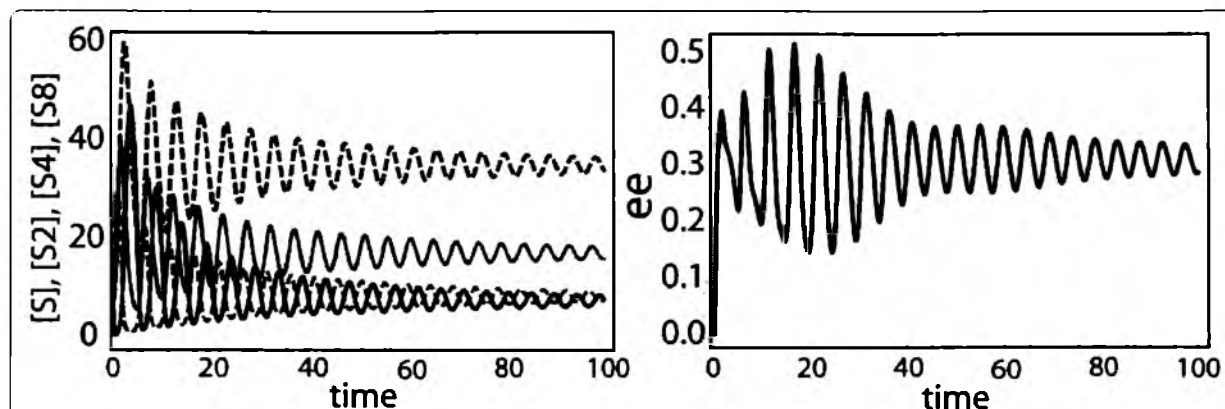


Figure 11 (a) Simulated concentration profiles of S (solid line), S_2 (dashed line), S_4 (solid gray line) and S_8 (dashed gray line) for model (3-9) $k_1 = k_2 = k_3 = k_4 = 1$, $k_5 = k_6 = 0.1$, $k_7 = 0.001$, $k_8 = 80$ and $k_9 = 40$; (b) enantiomeric excess, $ee = ([S] + 2[S_2] + 4[S_4] + 8[S_8] - [R] - 2[R_2] - 4[R_4] - 8[R_8]) / ([S] + 2[S_2] + 4[S_4] + 8[S_8] + [R] + 2[R_2] + 4[R_4] + 8[R_8])$. Initial conditions: $[S] = 18$, concentrations of other compounds equal to 6. Time and concentration units are dimensionless.



Oscillations appear in this scheme only if the rate constant for formation of heterodimers in steps (20) and (21) is greater than that for homodimers in step (18). The system is closed with respect to mass exchange: $c = [R] + [S] + [R^*] + [S^*] + 2([R_2] + [S_2] + [RS] + [SR]) = \text{const.}$

In the general case, RS and SR different chemically, so we have: $k_4 \neq k_5$, $k_6 \neq k_7 \neq k_{12} \neq k_{13}$, $k_8 \neq k_9 \neq k_{14} \neq k_{15}$ and $k_{10} \neq k_{11}$. Damped oscillations in a closed

system occur for a broad range of parameters. The dynamics contain a stationary state, which is a stable focus with a negative eigenvalue whose real part is small in magnitude. Such dynamical behavior leads to damped oscillations whose amplitude decreases slowly in time. Results of some simulations are shown in Fig. 13. Concentrations of activated forms of monomers S^* and R^* (not shown) are about 40 times smaller than concentrations of other species. Generally, activated forms can be detected only *in situ* because they exist only in the reacting mixture.

Conclusions

The experimental results presented here demonstrate that phenylglycine, which exists largely in the form of hydrogen-bonded dimers, can undergo a condensation reaction in ethanol-water solution to produce higher oligomers. The reaction occurs in a nonmonotonic fashion and is apparently linked with the oscillatory chiral conversion of amino acids reported previously [4-6]. The S- and R-enantiomers appear to differ somewhat in their dynamics, a phenomenon that may arise from the presence of different amounts of trace impurities in the commercial samples. Our observations also suggest that there are two different dimeric aggregates, with one being more reactive with respect to peptidization than the other.

We have briefly presented three approaches to modeling such systems, and in particular to obtaining oscillatory behavior in oligomer populations and enantiomeric excesses. More sophisticated models will need to integrate the various aspects of these processes more seamlessly, but until more detailed kinetic data and rate parameters are available, it seems unwise to attempt to build more specific models.

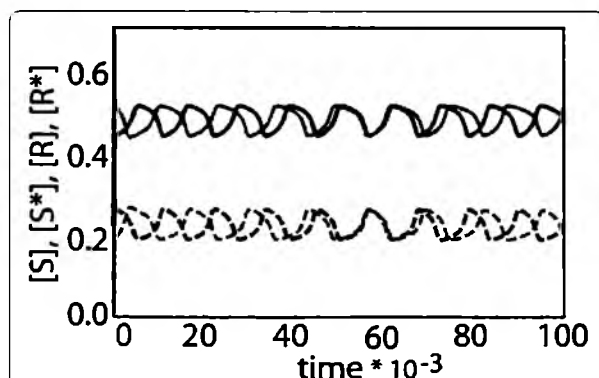
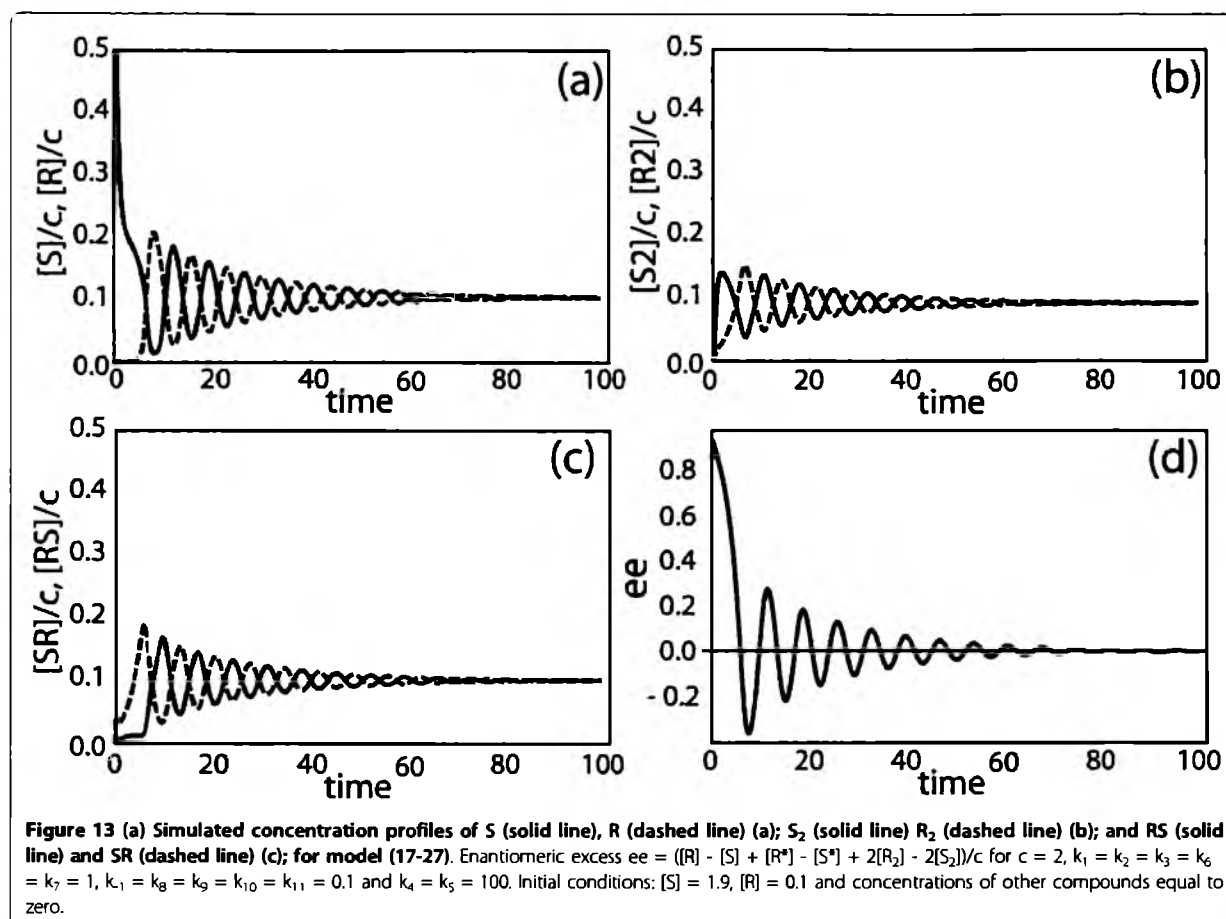


Figure 12 (a) Simulated concentration profiles of S (solid line), S^* (dashed line), R (solid gray line) and R^* (dashed gray line) for model (10-16) $k_1 = 0.02048$, $k_1 = 8.1k_1$, $k_2 = 1$, $k_3 = 10^{-8}$, $k_3 = 10^{-8}$, $k_4 = 10^{-4}$, $k_4 = 0.2479k_4$, $k_5 = 10^{-8}$, $k_6 = 10^{-8}$, $k_7 = k_7 = 10^{-8}$. Initial conditions: $[S] = 0.25$, $[S^*] = 0.5$, $[S_2] = [S_3] = 0.05$, $[R] = 0.7$, $[R^*] = 0.05$, $[R_2] = [R_3] = 0.04$ and $[SR] = 0$.



The phenomena we have described may be of considerable importance in processes of chemical self-organization and evolution. While the results and models presented here are relatively crude, they should lay the groundwork for further studies of these fascinating systems.

Acknowledgements

M.G. and D.K. were partially supported by PhD scholarships within the framework of the "University as a Partner of the Economy Based on Science" (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union. I.R.E. was supported by the U.S. National Science Foundation grant CHE-0615507.

Author details

¹Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland. ²Chemistry Department, MS 015, Brandeis University, Waltham, MA 02454-9110, USA. ³Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland.

Authors' contributions

MS and TK designed the experiments. MS, MG and DK performed the experiments. ML designed the models and carried out the simulations. TK and ML drafted the manuscript. IRE integrated the experiments and simulations and wrote the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 9 April 2010 Accepted: 18 August 2010

Published: 18 August 2010

References

1. Sajewicz M, Piętko R, Pieniak A, Kowalska T: Application of thin-layer chromatography (TLC) to investigating oscillatory instability of the selected profen enantiomers. *Acta Chromatogr* 2005, **15**:131-149.
2. Sajewicz M, Gontarska M, Wróbel M, Kowalska T: Enantioseparation and oscillatory transesterification of S,R-(±)-ketoprofen, as investigated by means of thin layer chromatography with densitometric detection. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2007, **30**:2193-2208.
3. Sajewicz M, Gontarska M, Kronenbach D, Wojtal L, Grygierczyk G, Kowalska T: Study of the oscillatory in vitro transesterification of the antimers of flurbiprofen and their enantioseparation by thin-layer chromatography (TLC). *Acta Chromatogr* 2007, **18**:227-238.
4. Sajewicz M, Kronenbach D, Gontarska M, Kowalska T: TLC and polarimetric investigation of the oscillatory in-vitro chiral inversion of L-alanine. *J Planar Chromatogr Modern TLC* 2008, **21**:43-47.
5. Sajewicz M, Gontarska M, Wojtal L, Kronenbach D, Leda M, Epstein IR, Kowalska T: Experimental and model investigation of the oscillatory transesterification of L-α-phenylalanine. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2008, **31**:1986-2005.
6. Sajewicz M, Kronenbach D, Staszek D, Wróbel M, Grygierczyk G, Kowalska T: Experimental investigation of the oscillatory transesterification of L-tyrosine. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2008, **31**:2006-2018.

7. Sajewicz M, John E, Kronenbach D, Gontarska M, Kowalska T: **TLC study of the separation of the enantiomers of lactic acid.** *Acta Chromatogr* 2008, **20**:367-382.
8. Sajewicz M, Kronenbach D, Gontarska M, Wróbel M, Piętko R, Kowalska T: **TLC in search for structural limitations of spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion. α -Hydroxybutyric and mandelic acids.** *J Planar Chromatogr Modern TLC* 2009, **22**:241-248.
9. Belanger P, Atkinson JG, Stuart RS: **Exchange reactions of carboxylic acid salts. Kinetics and mechanism.** *Chem J Chem Soc D: Commun* 1969, 1067-1068.
10. Xie Y, Liu H, Chen J: **Kinetics of base catalyzed racemization of ibuprofen enantiomers.** *Int J Pharm* 2000, **196**:21-26.
11. Sajewicz M, Matlengiewicz M, Leda M, Gontarska M, Kronenbach D, Kowalska T, Epstein IR: **Spontaneous oscillatory in vitro chiral conversion of simple carboxylic acids and its possible mechanism.** *J Phys Org Chem* .
12. Sajewicz M, Wrzałik R, Gontarska M, Kronenbach D, Leda M, Epstein IR, Kowalska T: **In vitro chiral conversion, phase separation, and wave propagation in aged profen solutions.** *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2009, **32**:1359-1372.
13. Peacock-López E, Radov DB, Flesner CS: **Mixed-mode oscillations in a self-replicating dimerization mechanism.** *Biophys Chem* 1997, **65**:171-178.
14. Tsai LL, Hutchinson GR, Peacock-López E: **Turing patterns in a selfreplicating mechanism with a self-complementary template.** *J Chem Phys* 2000, **113**:2003-2006.
15. Plasson R, Bersini H, Commeyras A: **Recycling Frank: Spontaneous emergence of homochirality in noncatalytic systems.** *Proc Nat Acad Sci USA* 2004, **101**:16733-16738.
16. Sajewicz M, Gontarska M, Kronenbach D, Kowalska T: **On the spontaneous abiotic peptization of phenylglycine in an aqueous medium.** *Acta Chromatogr* 2009, **21**:151-160.
17. Sajewicz M, Matlengiewicz M, Kronenbach D, Gontarska M, Kowalska T: **On the spontaneous condensation of selected hydroxy acids.** *Acta Chromatogr* 2009, **21**:259-271.
18. Matlengiewicz M, Sajewicz M, Gontarska M, Kronenbach D, Kowalska T: **On the spontaneous condensation of profens, with ketoprofen as an example.** *Acta Chromatogr* 2010, **22**:81-90.
19. Ivanov PV, Maslova VI, Bondareva NG, Yur'eva OA, Kozlova NV, Chernyshev EA, Odintsov KYu, Zykunova EA: **Concentration oscillations in the condensation of organosilanol.** *Russ Chem Bull* 1997, **46**:2138-2141.
20. Chernyshev EA, Ivanov PV, Golubykh DN: **Intermediates of chemical assembling of oligoorganosiloxanes in hydrolysis of organochlorosilanes.** *Russ Chem Bull* 2001, **50**:1998-2009.
21. Blackmond DG: **Mechanistic study of the Soai autocatalytic reaction informed by kinetic analysis.** *Tetrahedron: Asymmetry* 2006, **17**:584-589.
22. Micskei K, Rábai G, Gál E, Caglioti L, Pályi G: **Oscillatory symmetry breaking in the Soai reaction.** *J Phys Chem B* 2008, **112**:9196-9200.
23. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
24. Hyver C: **Generation of oscillations in polymerization-depolymerization systems.** *J Chem Phys* 1985, **83**:850-851.
25. Bykov VI, Gorban AN: **A model of autooscillations in association reactions.** *Chem Eng Sci* 1987, **42**:1249-1251.

doi:10.1186/1759-2208-1-7

Cite this article as: Sajewicz et al.: Condensation oscillations in the peptidization of phenylglycine. *Journal of Systems Chemistry* 2010 **1**:7.

Publish with ChemistryCentral and every scientist can read your work free of charge

"Open access provides opportunities to our colleagues in other parts of the globe, by allowing anyone to view the content free of charge."

W. Jeffery Hurst, The Hershey Company.

- available free of charge to the entire scientific community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
<http://www.chemistrycentral.com/manuscript/>



ChemistryCentral

Condensation oscillations in the condensation of mandelic acid

Mieczysław Sajewicz, Monika Gontarska, Dorota Kronenbach, Etienne Berry, and Teresa Kowalska *

Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

Key words:

Oscillatory condensation

Mandelic acid

High-performance liquid chromatography

Mass spectrometry

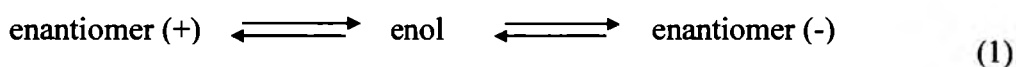
SUMMARY

In our earlier studies, we were the first to discover a spontaneous chiral conversion of the low-molecular-weight carboxylic acids dissolved in aqueous media, running *in vitro*. The investigated chiral carboxylic acids belong to the classes of profen drugs, amino acids, and hydroxy acids. Then the spontaneous chiral conversion running *in vitro* and accompanied by the spontaneous condensation of the discussed compounds was discovered. From the literature, we learnt to know that spontaneous condensation of certain chiral compounds sometimes can be oscillatory in nature. Thus we considered it noteworthy to check, if spontaneous condensation of the chiral low-molecular-weight carboxylic acids follows a linear, or a non-linear dynamic pattern. In this paper, we present the results of our studies on the dynamics of condensation of *S*-, *R*-, and *rac*-mandelic acid, carried out with aid of the high-performance liquid chromatography with the diode array detection (HPLC-DAD), and with aid of mass spectrometry (MS). The obtained data furnish reliable evidence that condensation of mandelic acid is oscillatory in nature. Finally, a theoretical model is recalled that jointly describes the oscillatory chiral conversion and the oscillatory condensation with *S*-, *R*-, and *rac*-mandelic acid.

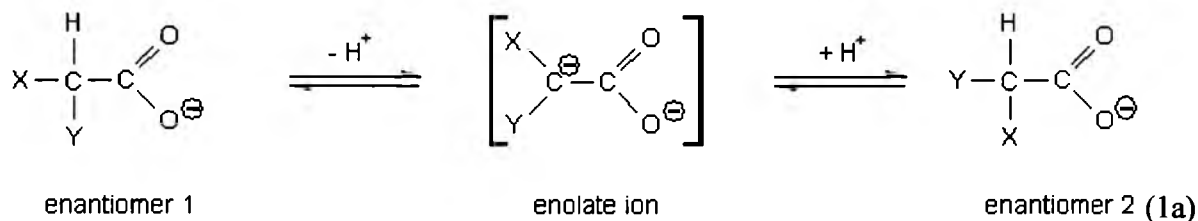
INTRODUCTION

The remarkable phenomenon of spontaneous *in vitro* oscillatory chiral conversion of selected profens, amino acids, and hydroxy acids has been in the focus of our attention for some time now. We first observed oscillatory chiral conversion in selected profens: *S*(+)-ibuprofen, *S*(+)-naproxen, *S,R*(±)-2-phenylpropionic acid, *S*(+)-flurbiprofen, *R*(-)-flurbiprofen, and *S,R*(±)-ketoprofen [1-3]. Later, we described an analogous behavior in several amino acids: *L*-alanine, *L*-α-phenylalanine, and *L*-tyrosine [4-6]. We have characterized similar phenomena in selected hydroxy acids also (*L*-lactic acid, *R*-α-hydroxybutyric acid, *S*-α-hydroxybutyric acid, *R*-mandelic acid, and *S*-mandelic acid) [7,8]. Most of these oscillatory chiral conversions were traced for the acid samples dissolved in 70% aqueous ethanol, although in several instances we have examined the non-aqueous solutions, too.

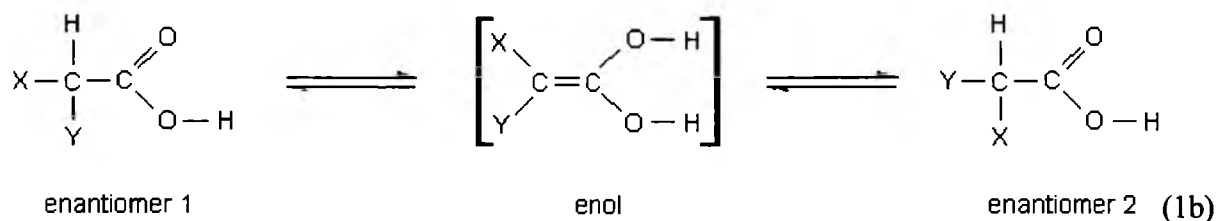
The general scheme of these chiral conversions can be simply summarized as



If we consider chiral conversion of selected carboxylic acids in aqueous solution in greater detail, then eq. (1) can be written as [9]:



In anhydrous media and in the presence of trace amounts of water, the probable mechanism of chiral conversion is given by eq. (1b) [10]:



where X = -NH₂, -OH, -Ar, etc., and Y = -R, etc.

In subsequent papers [11-13] we demonstrated via the biuret test [11] and ^{13}C NMR spectroscopy [12,13] that profens, amino acids, and hydroxy acids can also undergo spontaneous condensation or peptidization when stored for sufficient amount of time in 70% aqueous ethanol.

Ivanov et al. [14,15] have convincingly documented the oscillatory condensation of organosilanols (e.g., $\text{R}_2\text{Si}(\text{OH})_2$ or $\text{RR}'\text{Si}(\text{OH})_2$). There are several analogies between the results presented in their studies and those found in our own laboratory, which have inspired us to focus on the dynamics of condensation or peptidization of chiral low-molecular-weight carboxylic acids. For this reason, and because of the potential importance of this process in synthetic biology and chemical evolution, we have decided to focus on the issue of condensation of hydroxy acids coupled with their oscillatory chiral conversion [11]. More specifically, we scrutinized in this study the dynamics of condensation of the low-molecular-weight hydroxy acids, *R*-, *S*-, and *rac*-mandelic acid. The primary analytical tool that we employ to monitor the spontaneous condensation of mandelic acid samples dissolved in 70% aqueous ethanol was a non-chiral high-performance liquid chromatographic system with diode-array detection (HPLC-DAD). We also supplemented this technique with mass spectrometry (MS). Our earlier developed theoretical approach that captures the key aspects of the condensation and oscillatory chiral conversion processes with the low-molecular-weight chiral carboxylic acids seems valid for mandelic acid also [16].

EXPERIMENTAL

Reagents

R-(-)-Mandelic acid and *S*-(+)-mandelic acid of analytical purity grade were purchased from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA; cat. nos M2004 and 154210, respectively). Mandelic acid racemate was prepared by mixing optically pure *R* and *S* antimers in molar proportions of 1:1. For the spontaneous condensation experiment, we used the solutions of *R*-mandelic acid, *S*-mandelic acid, and *rac*-mandelic acid in 70% aqueous ethanol. The concentration of each optically pure enantiomer was 85 g L^{-1} (5.59 mol L^{-1}). Concentrations of the two antimers in the racemic mixture were such as to make the total concentration of mandelic acid equal to 85 g L^{-1} (5.59 mol L^{-1}). Samples were stored in the tightly stoppered colourless glass vials and spontaneous ageing of the respective solutions was carried out for nine days at the temperature of 22°C . As the reference samples, we used the solvent- and the

concentration-wise analogous samples of *R*-mandelic acid, *S*-mandelic acid, and *rac*-mandelic acid stored for the period of one year at 22°C.

High-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)

High performance liquid chromatographic analysis was carried out using a Gyncotek liquid chromatograph (Gyncotek, Macclesfield, UK) equipped with a Gyncotek Gina 50 model autosampler, Gyncotek P 580A LPG model pump, Gyncotek DAD UVD 340U model diode array detector, and Chromeleon Dionex v. 6.4 software for data acquisition and processing. The analyses were carried out in the isocratic mode, using an RP-18 (5 µm particle size) column (250 mm × 4.6 mm i.d.; Varian, Harbor City, CA, USA; cat. no. 1215–9307), and methanol – water (5:5, v/v) mobile phase at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The chromatographic column was thermostated at 35°C with use of the Varian Pro Star 510 model column oven.

Mass Spectrometric Analysis of the Freshly Prepared and Aged Samples

The freshly prepared and aged mandelic acid samples were introduced to the Varian 500-MS model mass spectrometer and they were analyzed in the ESI mode (full ESI-MS scan; positive ionization: spray chamber temperature 45°C, drying gas temperature 150°C, drying gas pressure 25 psi, capillary voltage 70 V, needle voltage 5 kV; negative ionization: spray chamber temperature 45°C, drying gas temperature 150°C, drying gas pressure 15 psi, capillary voltage 80 V, needle voltage 5 kV). Varian MS Workstation v. 6.9.1 software was used for data acquisition and processing.

RESULTS AND DISCUSSION

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

In Fig. 1, we present the chromatogram of the freshly prepared *rac*-mandelic acid sample (Fig. 1a) and of that stored in the solution for one year (Fig. 1b). One feature that these two chromatograms share in common is the presence of the predominant peak at the retention time $t_R = 8.0$ min, which represents the mandelic acid racemate. There are two main differences between the chromatograms of the freshly prepared and the aged *rac*-mandelic

acid solution. The first difference consists in the number of peaks in these two chromatograms. With the freshly prepared sample, the peak originating from the starting material predominates and with the aged sample, several additional and well pronounced peaks appear. The second difference consists in the intensity of the peak attributed to *rac*-mandelic acid as the starting compound ($t_R = 8.0$ min). In the freshly prepared sample, its concentration mirrored by the peak height equals to 1832 mAV, and in the aged sample it equals to 71 mAV only. This is the most immediate demonstration of a high consumption of the starting material in the course of the one year lasting ageing process.

New peaks that appear in the sample of the aged *rac*-mandelic acid and the lowering of the peak intensity with the signal at $t_R = 8.0$ min furnish an evidence that the starting material has undergone a spontaneous structural transformation in the course of the storage period. The two new peaks with the retention times higher than 8.0 min suggest that the molecular weights of the corresponding compounds are also higher than that of mandelic acid and hence, that mandelic acid might have undergone a spontaneous condensation.

In order to trace the process of the mandelic acid condensation more closely, we devised an experiment meant to trace time evolution of the chromatograms valid for the freshly prepared samples of *R*-mandelic acid, *S*-mandelic acid, and *rac*-mandelic acid, which were then stored for the period of nine days at ambient temperature. In this experiment, the chromatograms of each solution were recorded twice per day. Peak of each starting compound (*R*, *S*, or *rac*) was labeled as peak 1, and peaks of the two ageing products with the retention times higher than 8.0 min were labeled as peak 2 and peak 3, respectively (see Fig. 2).

In Fig. 2a, we show the chromatograms registered at 250 nm, i.e., at the same wavelength as the chromatograms shown in Fig. 1, and obtained for the three samples stored for the period of 8 days each. Due to the relatively short storage period and consequently, to the low yields of the condensation products, peak 2 is hardly visible at this particular wavelength and peak 3 is not visible at all. Therefore in Fig. 2b, we show these sections of the respective chromatograms which contain signals from the condensation products, registered at 202 nm. At this particular wavelength, peak 2 and peak 3 are clearly visible even after the 8 days short storage period only.

Time changes of the peak heights with peak 1, 2, and 3 are shown in Figs 3 a-c, in the form of the three different plots (one for each peak). The peak heights represent concentrations of the respective compounds and plotting them against time was meant to emphasize the concentration changes of the respective compounds with time. Time changes for peak 1, 2, and 3 are derived from the chromatograms registered at 250, 208, and 202 nm,

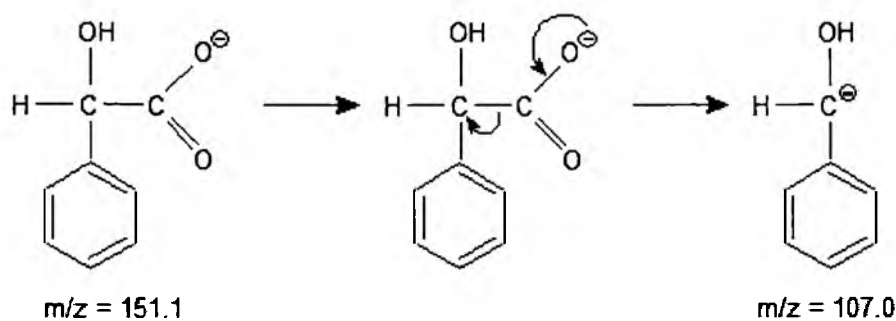
respectively. The three different wavelengths were chosen in order to provide the maximum intensity values and hence, the highest accuracy of quantification of the respective peak height changes with time.

The plot shapes given in Figs 3 a-c provide interesting and valuable information on the dynamics of ageing of the three investigated samples. Firstly, it is evident that concentration of the compounds labeled as peak 1, 2, and 3 changes in an oscillatory manner. From this observation it can be deduced that the condensation process with *R*-mandelic acid, *S*-mandelic acid, and *rac*-mandelic acid is oscillatory in nature. Then it has to be stressed that an overall trend of the changes with peak 1 is the lowering of its height, while with peak 2 and peak 3, it is the growth of their respective heights. In that way, it is additionally exposed that peak 1 represents the pure starting material, and peaks 2 and 3 represent the gradually cumulating transformation products. Last not least, if we compare the three plots shown in Figs 3 a-c, we can conclude that irrespective of the sample considered (*R*, *S*, or *rac*), the periodicity of the observed oscillatory changes is very similar.

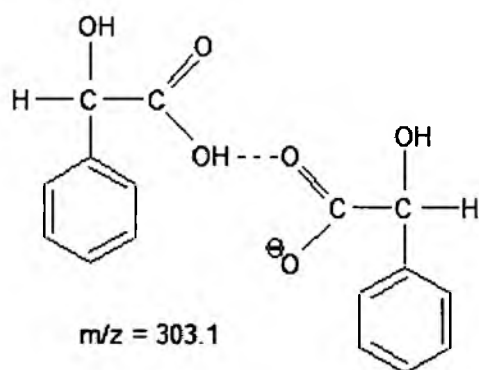
Mass Spectrometry (MS)

In order to obtain overall information about the composition changes with the samples of *R*-mandelic acid, *S*-mandelic acid and *rac*-mandelic acid stored for a longer period of time, we recorded mass spectra of the freshly prepared samples and of those stored for the period of one year, applying the positive and the negative ionization mode. The obtained mass spectra can be treated as the specific overall fingerprints of the analyzed samples.

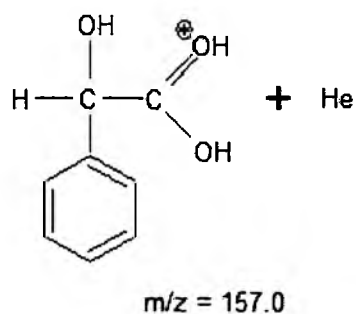
Differences between the two sets of the spectra recorded with the two different ionization modes were easy to notice. In most cases, spectra originating from the negative ionization mode contained two predominant peaks at m/z 151 and 311 (or at m/z 303, for the freshly prepared solution of *R*-mandelic acid). The only exception is furnished by the aged *rac*-mandelic acid sample, showing the single predominant peak at m/z 311. Presence of the peaks at m/z 151 and at 107 (the latter one appearing in most spectra recorded in the negative ionization mode) can easily be explained by the classical McLafferty rearrangement and fragmentation patterns applying to carboxylic acids, as shown in the below given scheme. Namely, the peak at m/z 151 originates from the deprotonated molecule of mandelic acid and that at m/z 107 represents basic fragmentation ion.



Peak appearing in the negative ionization mode at m/z 303 can originate from the H-bonded dimeric structure given in the below scheme:

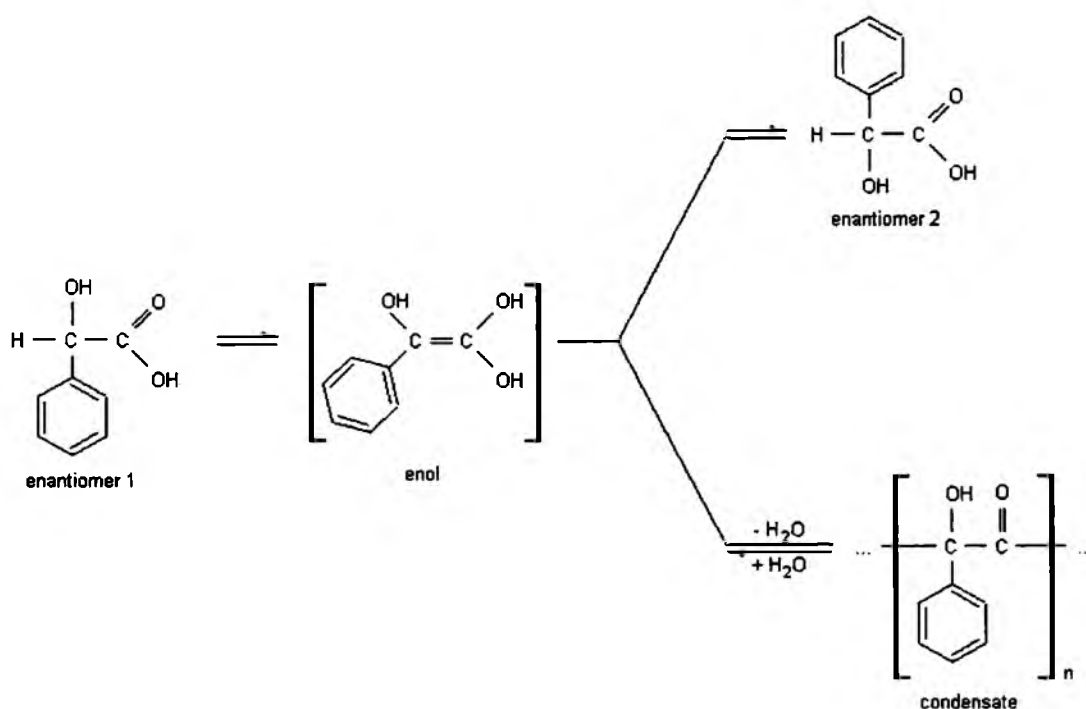


Contrary to the negative ionization mode, the positive mode results in the abundant mass spectroscopic fingerprints constituted by many peaks. Generally, it can be stated that the fingerprints originating from the aged samples and recorded in the positive ionization mode are considerably richer in the signals than those originating from the fresh samples, which is just another proof of structural changes with the starting material (i.e., with the mandelic acid samples) in the course of ageing. In that case, peak at m/z 157 appears on the most mass spectra of the fresh and aged mandelic acid samples, and it can be attributed to the below given ion:



For the sake of comparison, in Fig. 4 we show mass spectra of the freshly prepared *S*-mandelic acid sample and of that stored for the period of one year, recorded in the positive ionization mode. These two spectra give clear evidence of a considerable qualitative and quantitative change of *S*-mandelic acid in the course of storage and ageing the sample, which corresponds well with our chromatographic findings. The analogous results are valid for *R*-mandelic acid and *rac*-mandelic acid also, independent of the ionization mode used in the respective experiments.

In paper [16], we discussed possible mechanisms of chemical processes consisting of the spontaneous oscillatory chiral conversion and the spontaneous oscillatory condensation of the low-molecular-weight carboxylic acids belonging to the groups of profen drugs, amino acids, and hydroxy acids running in parallel. With mandelic acid, the general scheme of such process can be given in the following way:



CONCLUSION

It seems justified to conclude that the storage of *S*-mandelic acid, *R*-mandelic acid, and *rac*-mandelic acid results in oscillatory chiral inversion and oscillatory condensation, running in the parallel.

Acknowledgements

M.G. and D.K. were partially supported by PhD scholarships within the framework of the “University as a Partner of the Economy Based on Science” (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union.

References

- [1] M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **15**, 131 (2005)
- [2] M. Sajewicz, M. Gontarska., M. Wróbel, and T. Kowalska. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **30**, 2193 (2007)
- [3] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, Ł. Wojtal, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **18**, 227 (2007)
- [4] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr. - Modern TLC*, **21**, 43 (2008)
- [5] M. Sajewicz, M. Gontarska, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **31**, 1986 (2008)
- [6] M. Sajewicz, D. Kronenbach, D. Staszek, M. Wróbel, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **31**, 2006 (2008)
- [7] M. Sajewicz, E. John, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **20**, 367 (2008)
- [8] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, M. Wróbel, R. Piętka, and T. Kowalska. *J. Planar Chromatogr. - Modern TLC*, **22**, 241 (2009)
- [9] P. Belanger, J.G. Atkinson, and R.S. Stuart, *Chem. J. Chem. Soc. D: Commun.* 1067 (1969)
- [10] Y. Xie, H. Liu, and J. Chen, *Int. J. Pharm.*, **196**, 21 (2000)
- [11] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **21**, 151 (2009)
- [12] M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **21**, 259 (2009)
- [13] M. Matlengiewicz, M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **22**, 81 (2010)
- [14] P.V. Ivanov, V.I. Maslova, N.G. Bondareva, O.A. Yur'eva, N.V. Kozlova, E.A. Chernyshev, K.Yu. Odintsov, and E.A. Zykunova, *Rus. Chem. Bull.*, **46**, 2138 (1997)
- [15] E.A. Chernyshev, P.V. Ivanov, and D.N. Golubykh, *Rus. Chem. Bull.*, **50**, 1998 (2001)
- [16] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, M. Leda, T. Kowalska, and I.R. Epstein, *J. Syst. Chem.*, **1**:7 (2010); DOI:10.1186/1759-2208-1-7

Captions to Figures

Figure 1. The chromatograms of the *rac*-mandelic acid solution in 70% aqueous ethanol registered at 250 nm; (a) the freshly prepared sample, and (b) the sample after one year storage period

Figure 2. The chromatograms of the *R*-mandelic acid, *S*-mandelic acid, and *rac*-mandelic acid solutions in 70% aqueous ethanol after the 8 days storage period registered at (a) 250 nm and (b) 202 nm

Figure 3. Time changes of the chromatographic peak heights for (a) peak 1 (registered at 250 nm), (b) peak 2 (registered at 208 nm), and (c) peak 3 (registered at 202 nm) for *R*-mandelic acid, *S*-mandelic acid, and *rac*-mandelic acid. Peak numbers are, as given in Fig. 2

Figure 4. Mass spectra of the (a) freshly prepared and (b) stored for one year *S*-mandelic acid sample in the positive ionization mode

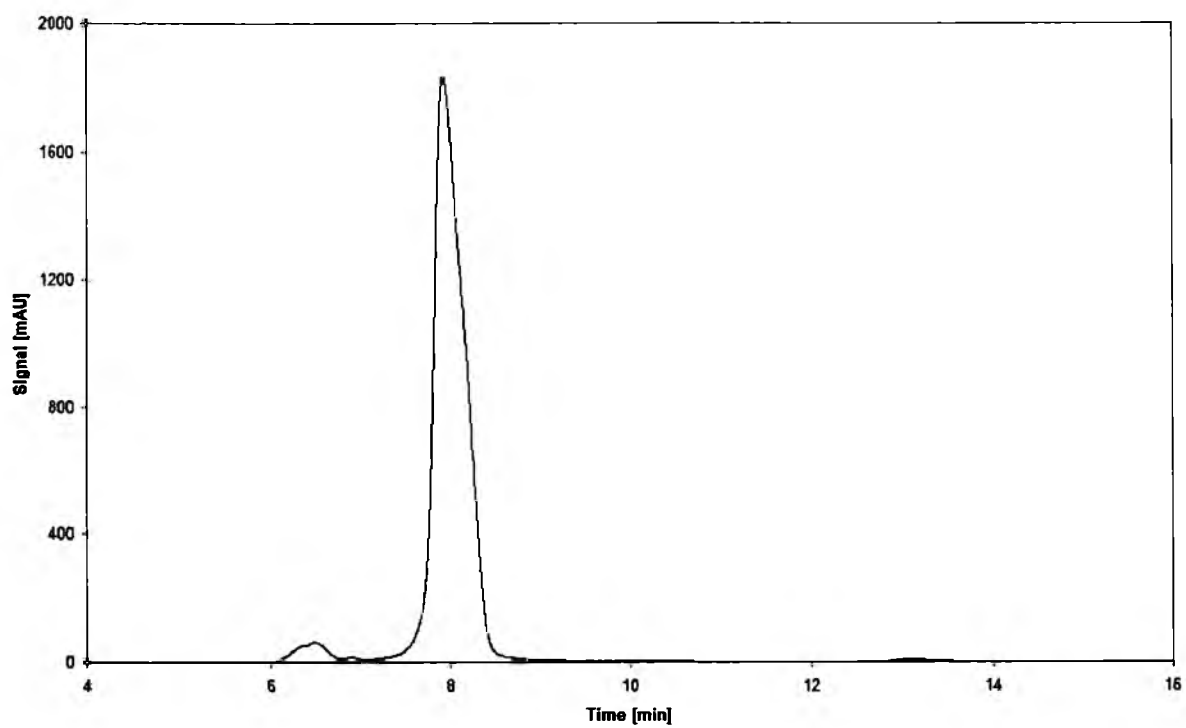


Fig. 1(a)

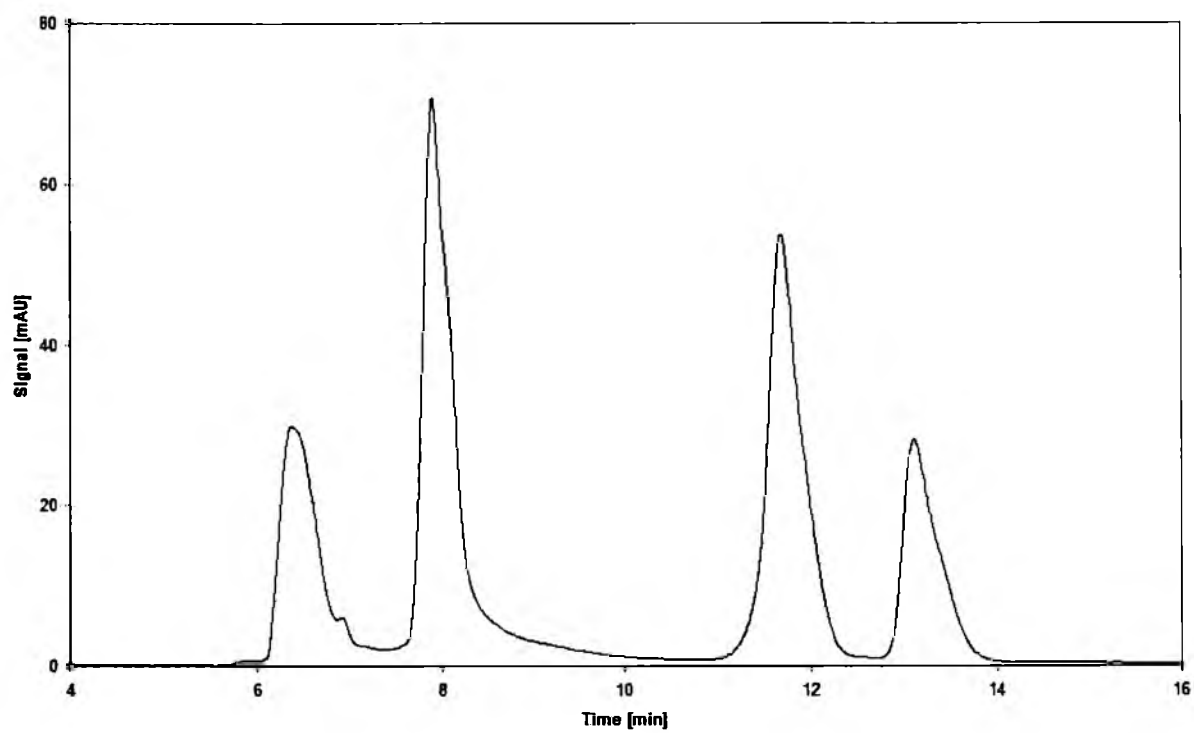


Fig. 1(b)

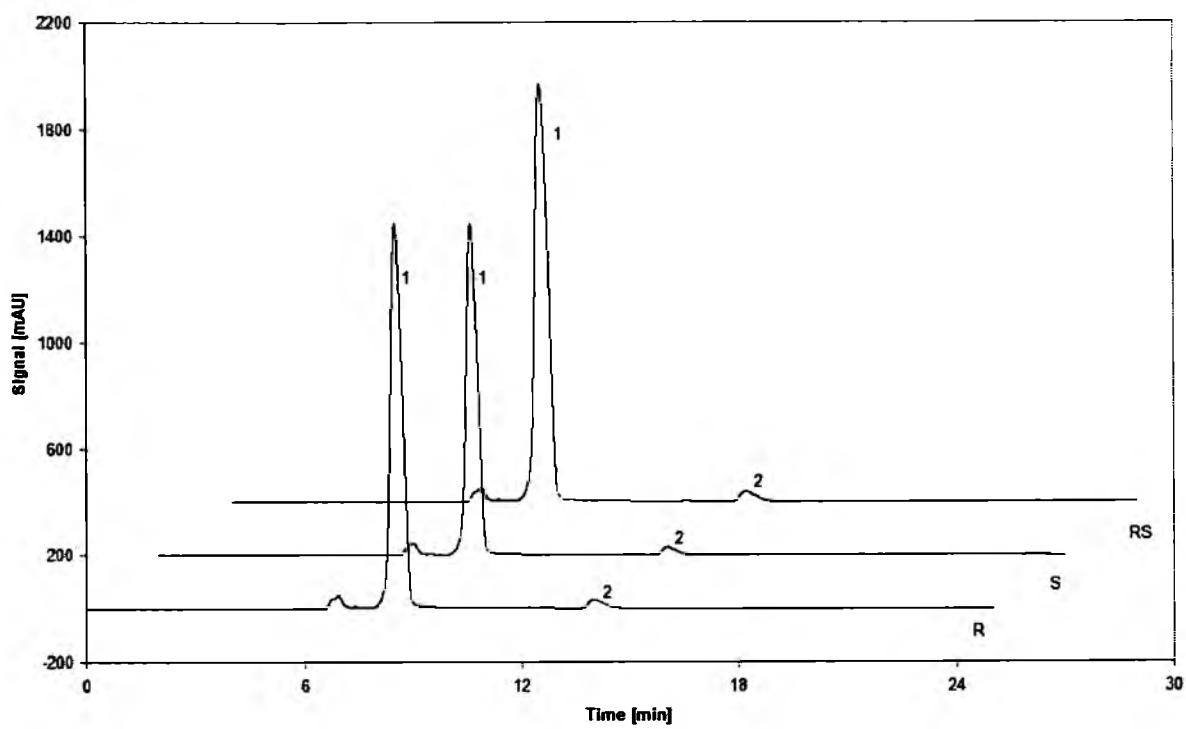


Fig. 2(a)

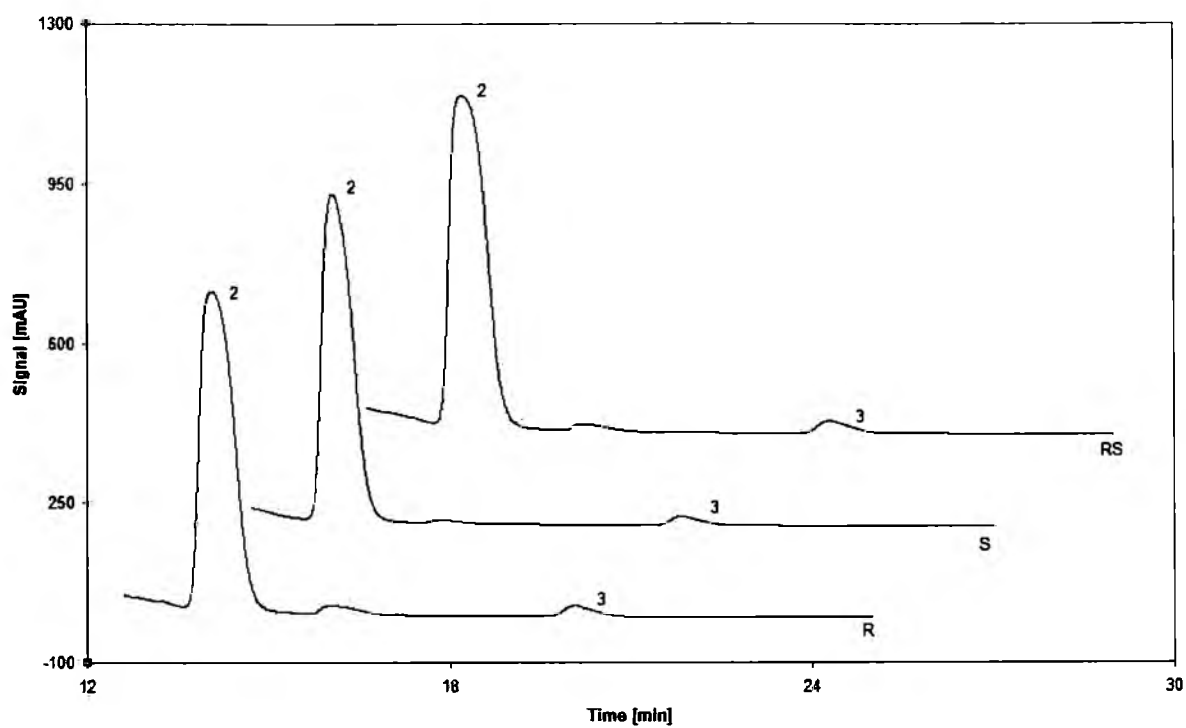


Fig. 2(b)

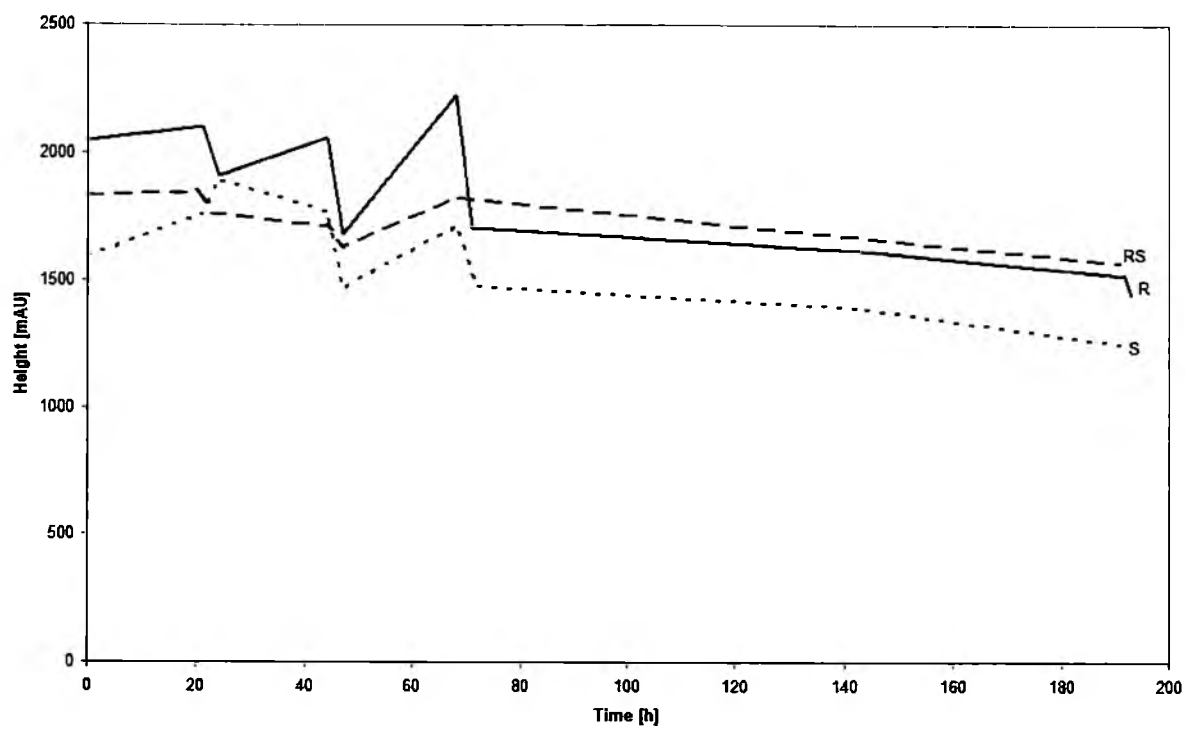


Fig. 3(a)

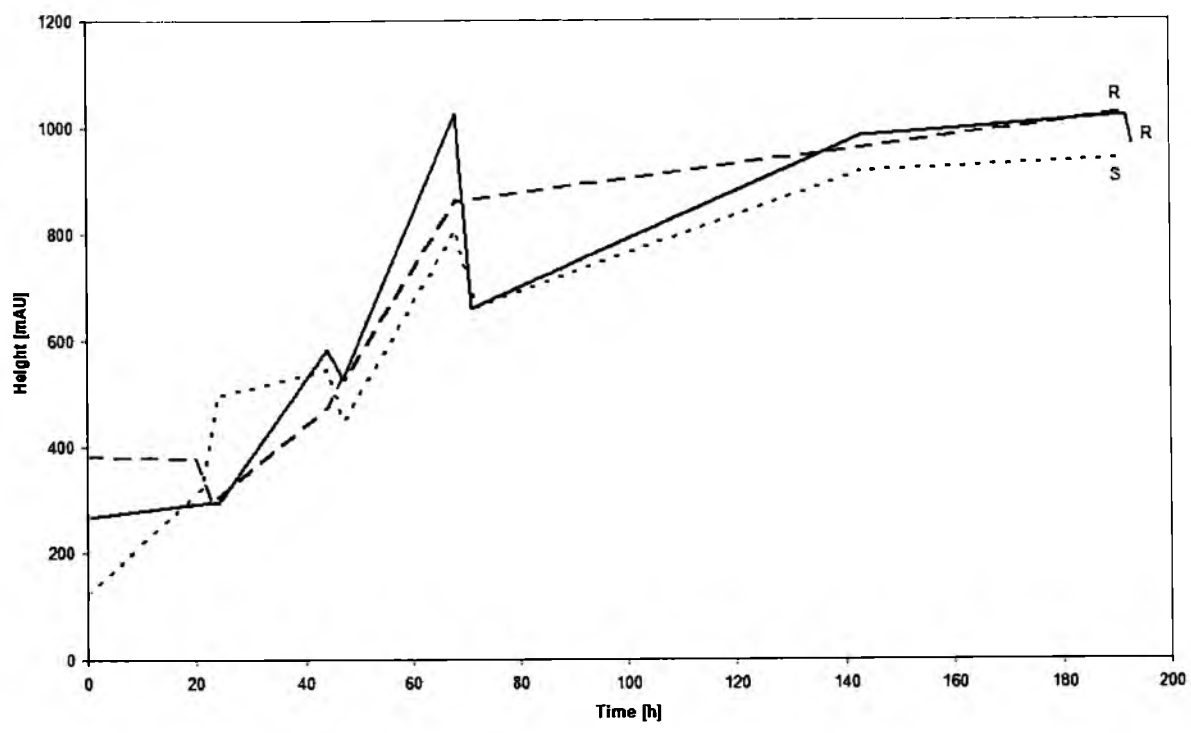


Fig. 3(b)

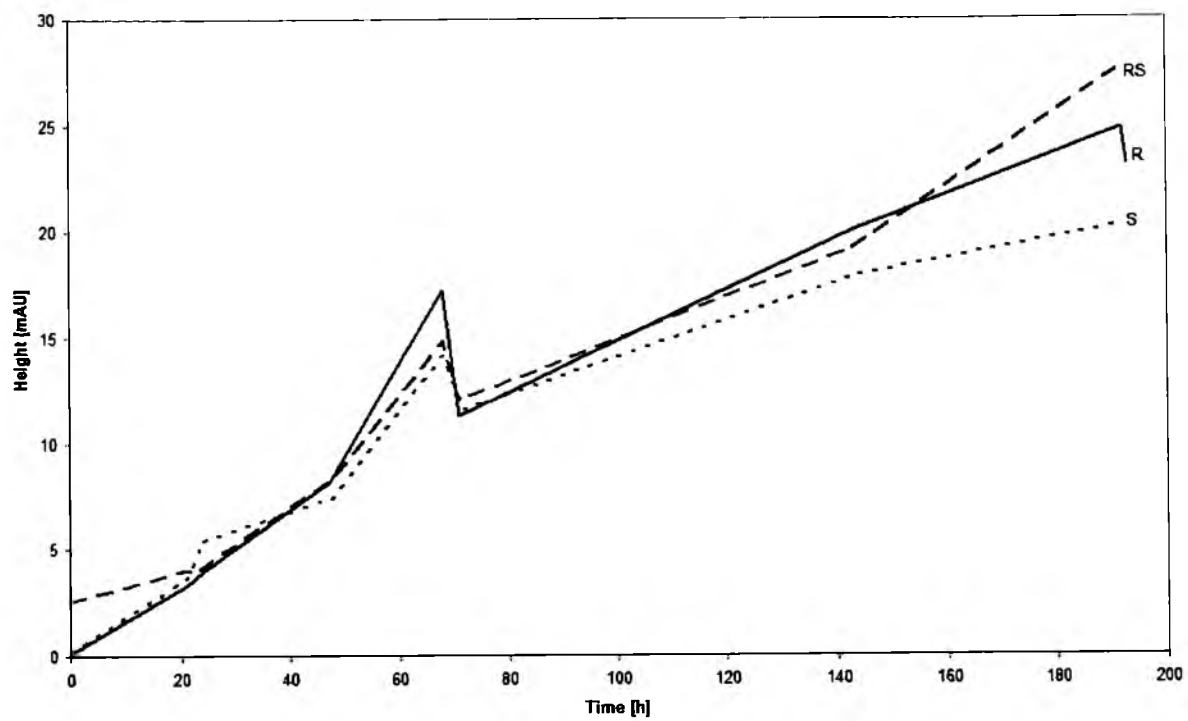


Fig. 3(c)

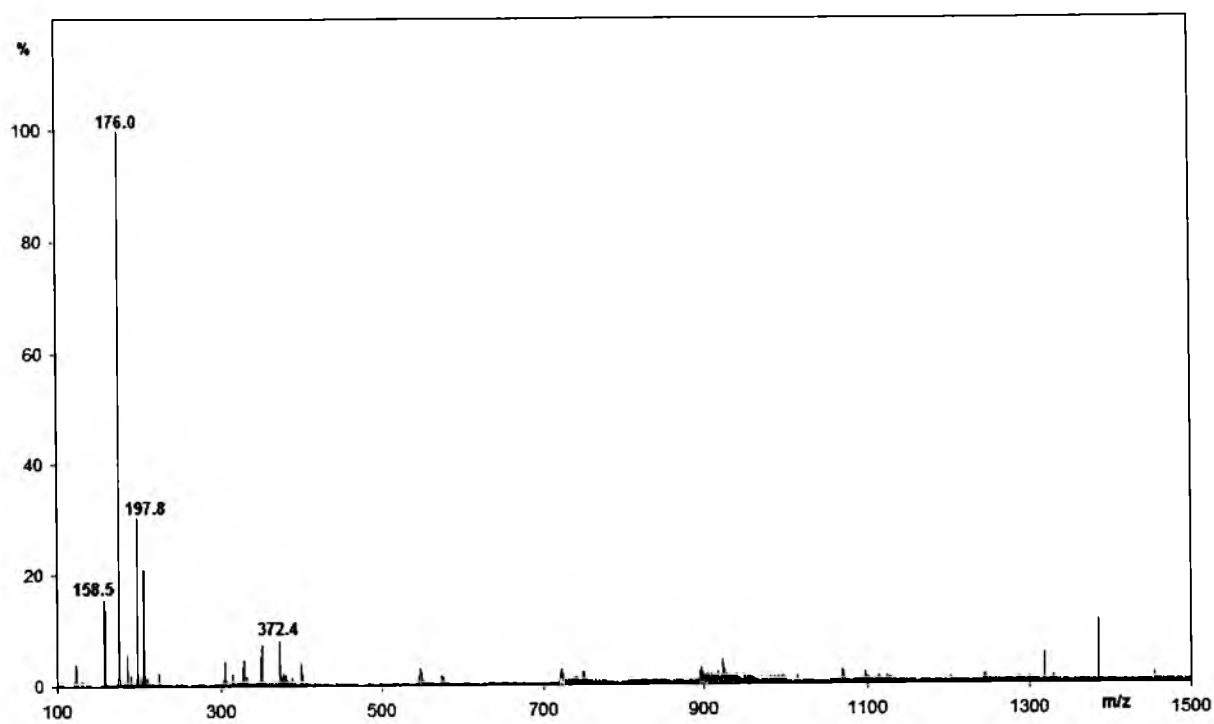


Fig. 4(a)

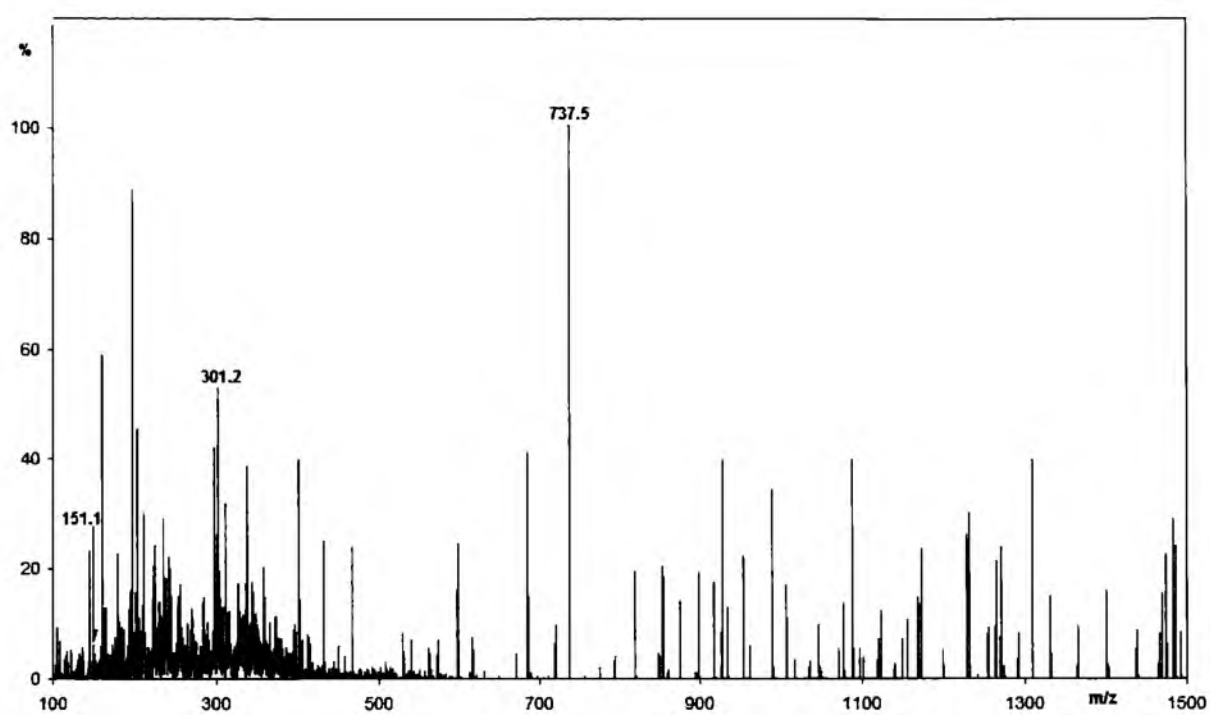


Fig. 4(b)

An HPLC-DAD and LC-MS study of condensation oscillations with *S*(+)-ketoprofen dissolved in acetonitrile

Mieczysław Sajewicz, Monika Gontarska, Dorota Kronenbach, Etienne Berry, and Teresa Kowalska*

Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

Key words:

Oscillatory condensation

S-(+)-Ketoprofen

HPLC-DAD

LC-MS

Author to whom correspondence should be addressed: teresa.kowalska@us.edu.pl

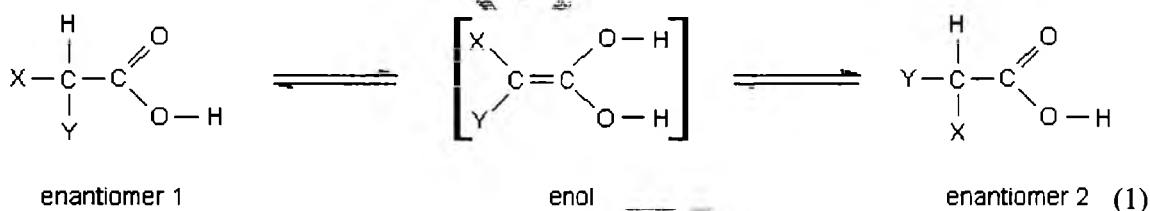
Abstract

In our earlier studies, we have described a spontaneous chiral conversion of the selected low-molecular-weight carboxylic acids dissolved in aqueous ethanol, running *in vitro*. Then we have found out that this spontaneous chiral conversion is accompanied by the spontaneous condensation. With several acids it was established that this condensation is also oscillatory in nature. In this paper, we present the results of our studies on the dynamics of condensation with *S*(+)-ketoprofen, when stored for certain amount of time dissolved in acetonitrile. Our investigations were carried out with aid of two high-performance liquid chromatographic systems with the diode array detection (HPLC-DAD), and of the third high-performance liquid chromatographic system equipped with mass spectrometric detection (LC-MS). In one cycle of chromatographic measurements, we managed to monitor condensation of *S*(+)-ketoprofen in the 25-min intervals for 30 h, thus obtaining kinetic information on the progress of this process. Mass spectrometric detection confirmed the presence of new species in the stored solution with molecular weights much higher than that of *S*(+)-ketoprofen, which can be attributed to the condensation products. The obtained data show that condensation of *S*(+)-ketoprofen dissolved in acetonitrile progresses in an oscillatory manner. A theoretical model was referenced that jointly describes the oscillatory chiral conversion and the oscillatory condensation with the low-molecular-weight chiral carboxylic acids.

Introduction

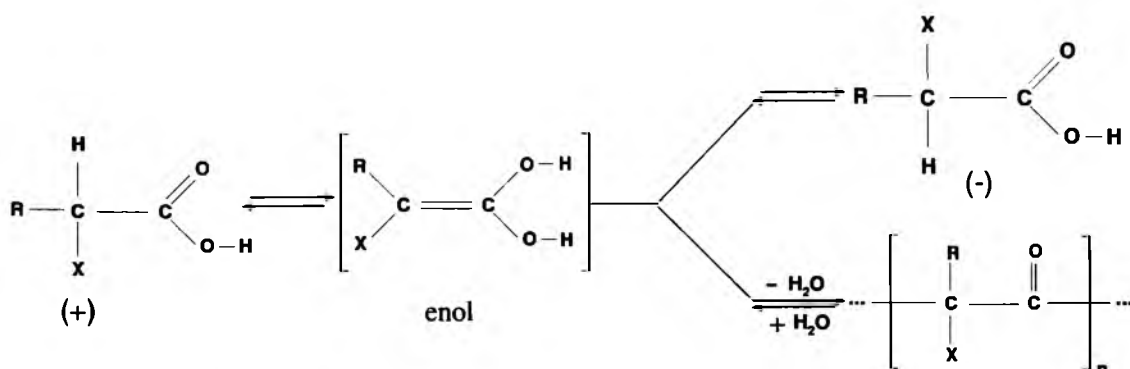
In our earliest studies, we have provided wide experimental evidence on the spontaneous oscillatory chiral conversion running *in vitro* with the selected low-molecular-weight carboxylic acids belonging to the class of profens, amino acids, and hydroxy acids, when dissolved in the aqueous media. An overview of these investigations is given in paper (1). In paper (2), we have for the first time signalized that the selected profen drugs (i.e., ibuprofen and naproxen) can undergo the spontaneous oscillatory chiral conversion in a non-aqueous medium also (i.e., in dichloromethane). Moreover, the oscillatory chiral conversion has been reported in the crystallization of the (+) and (-) enantiomers of 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one (3).

The general scheme of the spontaneous chiral conversions run with the low-molecular-weight carboxylic acids in anhydrous media or in presence of trace amounts of water can be given by eq. (1) (4):



where X: -NH₂, -OH, -Ar, etc., and Y: -R, etc.

Later, we have collected experimental evidence pointing out to the spontaneous peptidization of amino acids, and condensation of hydroxy acids and profen drugs (5) running in the aqueous media *in vitro*, in parallel with the process of the oscillatory chiral conversion. This evidence was collected by means of different analytical techniques, e.g., by means of thin-layer chromatography (TLC) and the ¹³C NMR spectroscopy. A simple scheme of such process running with profens is given below (eq. 2).



where R = CH₃, and X = Ar

(2)

In paper (6), we experimentally demonstrated the spontaneous oscillatory nature of peptidization of *R*-, *S*-, and *rac*-phenylglycine in the aqueous ethanol medium and theoretical models were proposed with an explanation of the observed phenomenon.

In the literature (7, 8), the confirmatory reports are available on spontaneous condensation similar to that observed in our studies that is oscillatory in nature. Those results seem relevant to our own earlier results, as the oscillatory condensation documented by the authors was running in the aqueous organic media and involved chiral organosilanol substrates.

It is the aim of this study to investigate *S*(+)-ketoprofen with respect of its ability to undergo the spontaneous oscillatory condensation in acetonitrile as a non-aqueous medium and to trace the dynamics of such a process by means of high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection (HPLC-DAD and LC-MS, respectively). Our earlier developed theoretical approach that captures the key aspects of the condensation and oscillatory chiral conversion processes with the low-molecular-weight chiral carboxylic acids seems valid for *S*(+)-ketoprofen also (6).

Experimental

Reagent

S(+)-Ketoprofen of analytical purity grade was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA; cat. no 471909-1G). For the spontaneous condensation experiment, we used solution of *S*(+)-ketoprofen in acetonitrile (ACN). Concentration of the optically pure enantiomer was 1 g L⁻¹ (3.93 × 10⁻³ mol L⁻¹). Sample was stored in the tightly stoppered colourless glass vial and its spontaneous ageing was carried out for several weeks at 22°C.

High-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)

High performance liquid chromatographic analysis was carried out using two different liquid chromatographs equipped with the diode array detectors (HPLC-DAD) and the two different chromatographic columns, in order to obtain a double set of the experimental evidence.

The Gyncotek liquid chromatograph (Gyncotek, Macclesfield, UK) was equipped with a Gyncotek Gina 50 model autosampler, Gyncotek P 580A LPG model pump, Gyncotek DAD UVD 340U model diode array detector, and Chromeleon Dionex v. 6.4 software for data acquisition and processing. The analyses were carried out in the isocratic mode, using the Hypersil GOLD (5 μm particle size) column (250 mm \times 4.6 mm i.d.; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA; cat. no. 0694830N), and methanol – water (5:5, v/v) mobile phase at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹. The chromatographic column was thermostated at 35°C with use of the Varian Pro Star 510 model column oven. The analyses with use of this system were carried out in the 25-min intervals for 30 h.

The Varian model 920 liquid chromatograph (Varian, Harbor City, CA, USA) was equipped with Galaxie software for data acquisition and processing. The analyses were carried out in the isocratic mode, using the Pursuit 5 C18 (5 μm particle size) column (250 mm \times 4.6 mm i.d.; Varian, Harbor City, CA, USA; cat. no. A3000250C046), and methanol – water (5:5, v/v) mobile phase at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹. The respective chromatogram presented in this study was recorded for the *S*-(+)-ketoprofen sample after 8 days of storage time.

High-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (LC-MS)

Liquid chromatographic analysis with mass spectrometric detection (LC-MS) was carried out using an LC-MS System Varian (Varian, Palo Alto, CA, USA) equipped with a Varian ProStar model pump, Varian 100-MS mass spectrometer, and Varian MS Workstation v. 6.9.1 software for data acquisition and processing.

The LC analyses were carried out in the isocratic mode, using a Pursuit X R_s 3-C18 column (50 mm \times 2.0 mm i.d.; Merck KGaA, Darmstadt, Germany; cat. no. A6001050C020) and methanol–water (5:5, v/v) mobile phase at the flow rate of 0.20 mL min⁻¹.

Mass spectrometric detection was carried out in the ESI mode (full ESI-MS scan, positive ionization, spray chamber temperature 45°C, drying gas temperature 150°C, drying gas pressure 25 psi, capillary voltage 70 V, needle voltage 5 kV).

Results and discussion

High-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)

In Fig. 1, we show the chromatogram registered for the freshly prepared sample of *S*(+)-ketoprofen in ACN. Apart from the predominant peak of *S*(+)-ketoprofen, two more peaks of low intensity are also observed. Most probably, these two additional peaks are the condensation products, as the investigated compound does not decompose under the applied working conditions. The chromatogram is implemented with the three inlets showing the UV spectra recorded from the respective peak maxima for the three separated species. The only difference among these three UV spectra consists in the intensity of absorbance, and the least intense spectrum is attributed to peak no. 3. One could simply conclude that the higher is the molecular weight of a condensate the lower is its yield.

In the course of the 30-h sample storage period, the number of the peaks on the chromatograms recorded in the 25-min intervals periodically changed. This process is shown in Fig. 2 in the form of nine chromatograms considered as specific snapshots. These snapshots are valid for the gradually ageing sample of *S*(+)-ketoprofen and the time evolution of the respective chromatograms is evident from these plots. In the initial period, the chromatograms clearly show three peaks (Figs 2a, b). After ca. 10 h storage period, only two peaks are left on the chromatogram (peaks nos 1 and 2; Figs 2c, d) and disappearance of peak no. 3 is complete. After 18 h of running the experiment, only peak no. 1 can be seen (Fig. 2e), but after 19 h peak no. 2 emerges again (Figs 2f-h) and in the last hour of running the experiment, once more we can see the three peaks (Fig. 2i). It is noteworthy that throughout the entire experiment, peak no. 1 (attributed to the starting sample, i.e., to *S*(+)-ketoprofen), is present in the chromatogram. The observed changes in the consecutive chromatograms are irregular yet oscillatory in nature. It is most probable that the discussed periodical changes of sample composition are due to formation and decomposition of ketoprofen condensates, represented by peaks nos 2 and 3.

Changes in the peak heights for peaks nos 1 and 2 (roughly equivalent to the respective concentrations of the two species) in the function of time are shown in Fig. 3. We

refrained from adding the analogous plot for peak no. 3, as it appeared on the chromatograms in the first and the last (i.e., thirtieth) hour of the experiment only. Shapes of the two plots shown in Fig. 3 are similar in this sense that they are both non-monotonic but oscillatory.

After eight days from preparation of the *S*(+)-ketoprofen solution in acetonitrile, the *S*(+)-ketoprofen sample was again analyzed by means of chromatography and the obtained results are shown in Fig. 4. The chromatogram (Fig. 4a) and the spectrogram-chromatogram (Fig. 4b) both witness to the presence of more than the three peaks in the aged sample (eight days old). Apart from the peaks numbered as (I) and (II), in the time range from 10 to 15 min one can perceive four additional bands. Peak (I) can again be ascribed to *S*(+)-ketoprofen, as an equivalent of peak no. 1 on the chromatograms shown in Figs 1 and 2. The anti-Langmuir shape of peak (II) (which characterizes with the desorption front much steeper than the tailing adsorption front) can signalize complex intermolecular interactions of the involved chemical species (maybe the presence in the analyzed sample of the effective lateral interactions through the hydrogen bonds). The UV spectrum shown in Fig. 4c, identical for both peaks (I) and (II), can serve as an additional proof that peak (II) represents the condensed ketoprofen.

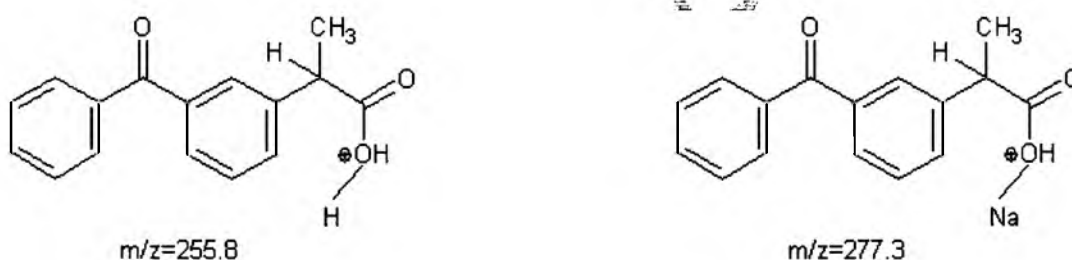
High-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (LC-MS)

The chromatographic investigation on ageing of the *S*(+)-ketoprofen solution in acetonitrile (first performed with use of the HPLC-DAD system and described in the previous section) was now repeated with use of the LC-MS system. Due to the different working parameters of the liquid chromatographic systems (basically caused by the different column manufacturers, geometries and packings, and by the different column temperatures) and first of all, due to a different chromatogram-generating mode (MS detector in place of DAD), the obtained chromatograms are also different. A summary of the obtained results is shown in Figs 5 and 6.

In Fig. 5, we show a sequence of six chromatograms collected in the span of almost 50 h of the *S*(+)-ketoprofen ageing time. According to the changing pattern of the respective concentration profiles, all these chromatograms can be divided into the two groups and it is evident that one chromatogram type evolves to the other and *vice versa* in a cyclic manner. Type 1 chromatograms show several tiny peaks at $t_R \approx 1$ min and one predominant peak at $t_R \approx 10$ min (Figs 5a, b, and d). Type 2 chromatograms show the predominant sharp peak at $t_R \approx 1$ min and one broad band at $t_R \approx 5$ min (Figs 5c, e, and f). Peak at the retention time $t_R \approx 1$ min observed in the both types of the chromatograms most probably originates from

ketoprofen. Cyclic changes of peak positions and areas for the peaks appearing at t_R equal to ca. 5 and 10 min can be due to the oscillatory formation and decay of ketoprofen condensates in the ageing solution. Growth of the condensate concentration is most probably represented by the chromatograms type 1 (Figs 5a, b, and d). This supposal can be confirmed by at least two observations. Firstly, the predominant peak at $t_R \approx 10$ min has an anti-Langmuir shape which suggests a multi-layer adsorption of the condensates on stationary phase, with the respective condensate molecules kept together by the H-bonds. Secondly, high intensity of the predominant peak at $t_R \approx 10$ min can be due to cumulating a considerable number of phenyl groups per one condensate molecule. With chromatograms type 2 (Figs 5c, e, and f), the peak at $t_R \approx 1$ min tends to be more intense than that at $t_R \approx 5$ min. Moreover, position of the second peak at $t_R \approx 5$ min suggests that the molecular weight of the respective condensates is lower than of those appearing at $t_R \approx 10$ min.

Fig. 6 shows two chromatograms with the insets of mass spectra for each separated peak. The chromatogram shown in Fig. 6a represents type 1 (analogous to those shown in Figs 5a, b, and d), while the chromatogram shown in Fig. 6b represents type 2 (like those shown in Figs 5c, e, and f). In the mass spectra of the peaks with the higher retention times, the signals with $m/z > 500$ are abundant and they most probably correspond with ketoprofen condensates derived by coupling of several monomer units. Two peaks which are particularly well visible in almost each mass spectrum appear at m/z equal to 255.8 and 277.3. The most probable structures of the respective peaks are given below:



In paper (6), we discussed possible mechanisms of chemical processes consisting of the spontaneous oscillatory chiral conversion and the spontaneous oscillatory condensation of the low-molecular-weight carboxylic acids belonging to the groups of profen drugs, amino acids, and hydroxy acids running in parallel. These mechanisms seem valid for the case of *S*(+)-ketoprofen also.

Acknowledgement

The work of two of the authors (M.G. and D.K.) was partially supported by PhD scholarships granted to them in 2009 within the framework of the 'University as a Partner of the Economy Based on Science' (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union.

FOR REVIEW ONLY

References

1. M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, M. Leda, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, and I.R. Epstein. Spontaneous oscillatory In vitro chiral conversion of simple carboxylic acids and its possible mechanism. *J. Phys. Org. Chem.* **23**: 1066-1073 (2010).
2. M. Sajewicz, R. Piętko, A. Pieniak, and T. Kowalska. Application of thin-layer chromatography (TLC) to investigate oscillatory instability of the selected profen enantiomers in dichloromethane. *J. Chromatogr. Sci.* **43**: 542-548 (2005).
3. G.A. Potter, C. Garcia, R. McCague, B. Adger, and A. Collet. Oscillating crystallization of (+) and (–) enantiomers during resolution by entrainment of 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one. *Angew. Chem. Int. Ed.* **35**: 1666-1668 (1996).
4. Y. Xie, H. Liu, and J. Chen. Kinetics of base catalyzed racemization of ibuprofen enantiomers. *Int. J. Pharm.* **196**: 21-26 (2000).
5. M. Matlengiewicz, M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska. On the spontaneous condensation of profens, with ketoprofen as an example. *Acta Chromatogr.* **22**: 81-90 (2010).
6. M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, and T. Kowalska. Condensation oscillations in the peptidization of phenylglycine. *J. Syst. Chem.* **1**:7 (2010); DOI:10.1186/1759-2208-1-7
7. P.V. Ivanov, V.I. Maslova, N.G. Bondareva, O.A. Yur'eva, N.V. Kozlova, E.A. Chernyshev, K. Yu. Odintsov, and E.A. Zykunova. Concentration oscillations in the condensation of organosilanols. *Rus. Chem. Bull.* **46**: 2138-2141 (1997).
8. E.A. Chernyshev, P.V. Ivanov, and D.N. Golubykh. Intermediates of chemical assembling of oligoorganosiloxanes in hydrolysis of organochlorosilanes. *Rus. Chem. Bull.* **50**: 1998-2009 (2001).

Captions to Figures

Figure 1. The chromatogram of the freshly prepared *S*(+)-ketoprofen solution in ACN registered with use of the Gyncotec liquid chromatograph at 259 nm. Retention times: peak no. 1, 7.66 min; peak no. 2, 9.68 min; peak no. 3, 11.80 min. Insets show UV spectra of the separated species recorded at the maxima of the respective peaks.

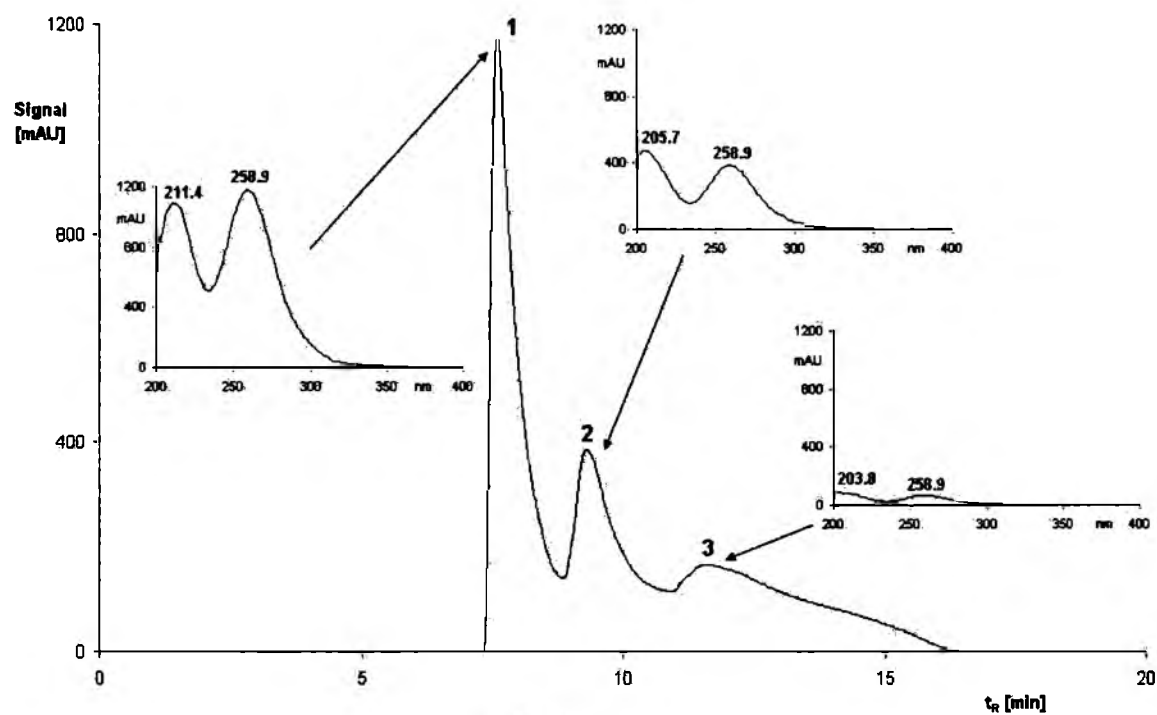
Figure 2. Sequence of the nine chromatographic concentration profiles registered with use of the Gyncotec liquid chromatograph at 259 nm for the *S*(+)-ketoprofen solution in ACN after (a) 0 h; (b) 5.5 h; (c) 9.5 h; (d) 18 h; (e) 19 h; (f) 20 h; (g) 24.5 h; (h) 28 h; and (i) 30 h storage time at 22°C.

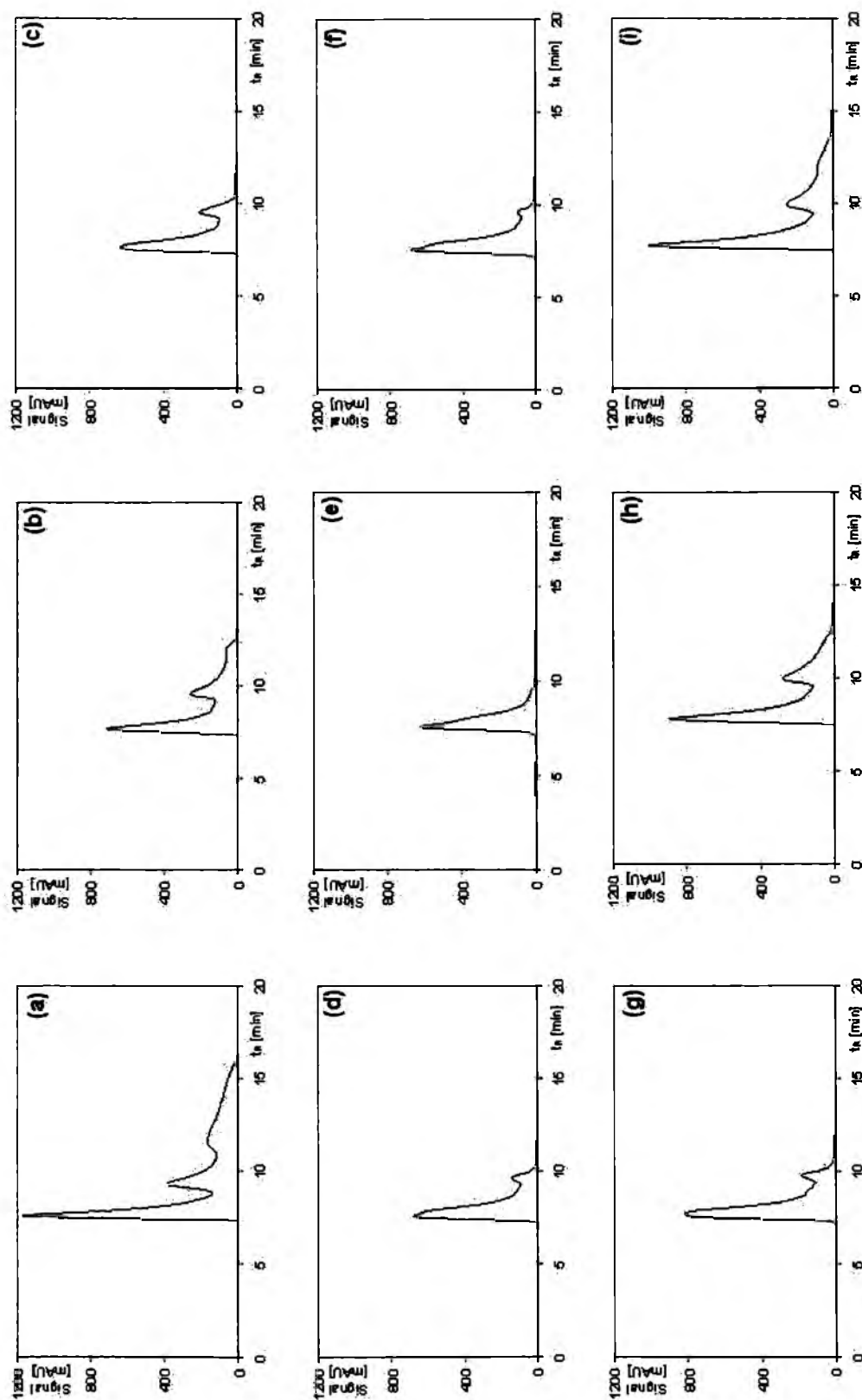
Figure 3. Time changes of the chromatographic peak heights for the *S*(+)-ketoprofen solution in ACN stored at 22°C for 30 hours. Peak numbers, as given in Fig. 1.

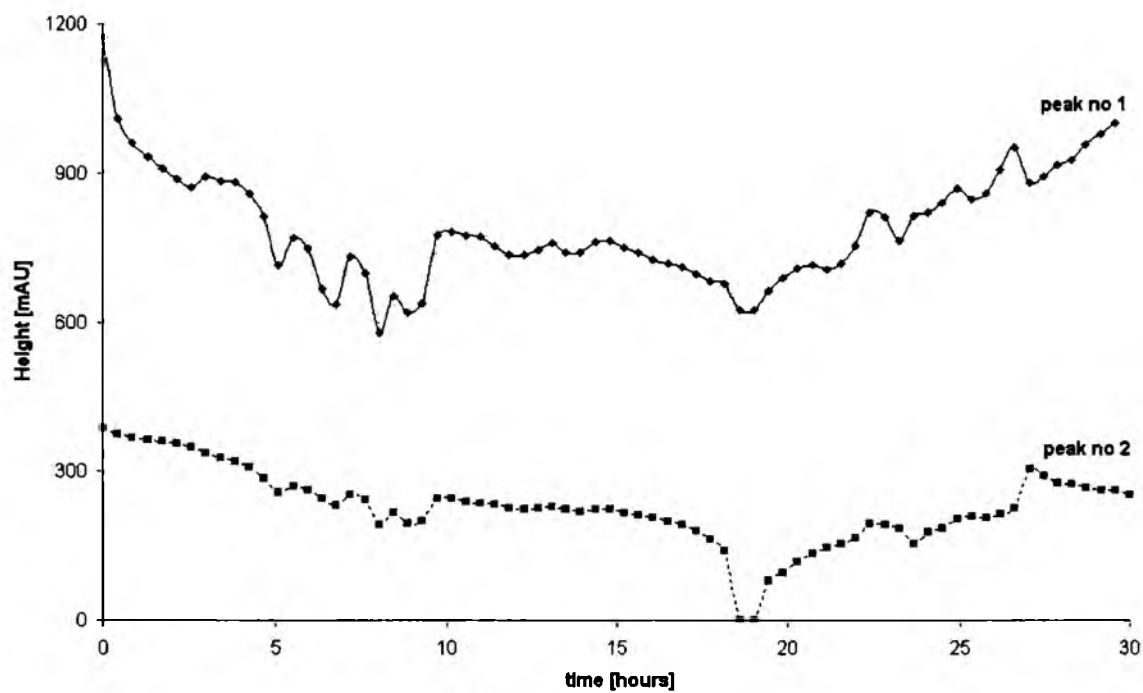
Figure 4. (a) The chromatogram of the *S*(+)-ketoprofen solution in ACN after eight days storage period registered with use of the Varian liquid chromatograph at 257 nm. Retention times: peak (I), 8.28 min, peak (II), 28.45 min. (b) The 2D spectrogram-chromatogram registered for the same sample. (c) The UV spectrum of the peaks at 8.28 min (*S*(+)-ketoprofen) and at 28.45 min (the ketoprofen condensate) retention time.

Figure 5. Sequence of the six chromatographic concentration profiles registered with use of the Varian LC-MS system for the *S*(+)-ketoprofen solution in ACN after (a) 0 h; (b) 24 h; (c) 43.5 h; (d) 44.5 h; (e) 45.5 h; and (f) 47.5 h storage time at 22°C.

Figure 6. The chromatogram of the *S*(+)-ketoprofen solution in ACN registered with use of the Varian LC-MS system after (a) 44.5 h and (b) 43.5 h storage time. Insets show mass spectra of the separated species recorded at the maxima of the respective peaks.

**Fig. 1.**

**Fig. 2.**

**Fig. 3.**

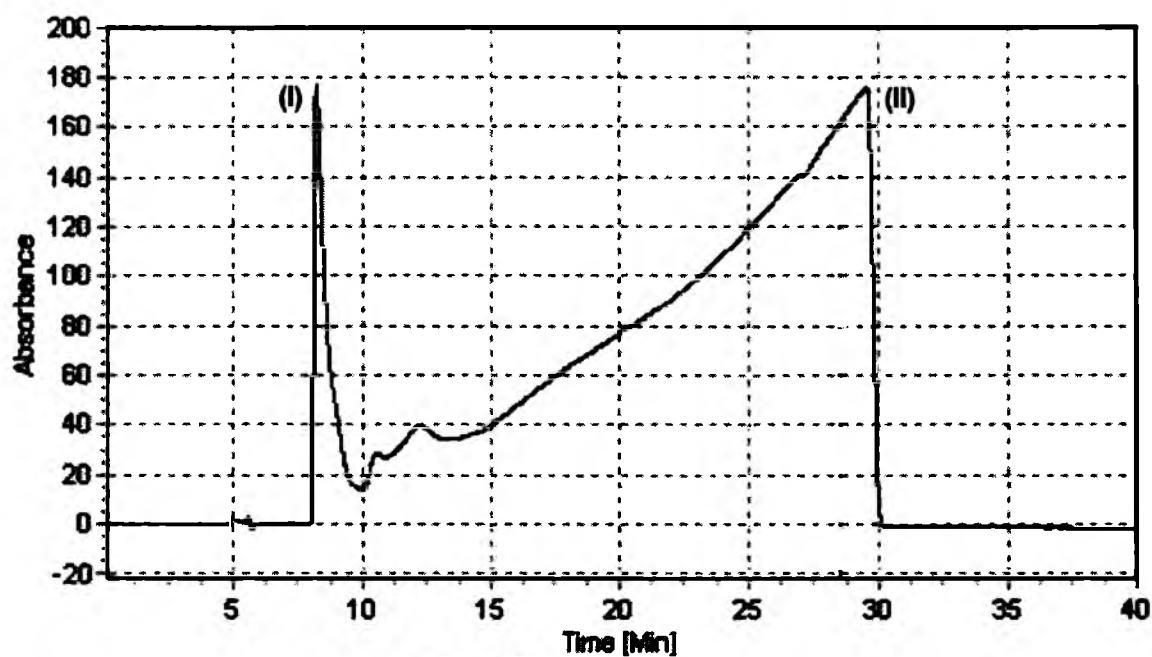


Fig. 4a.

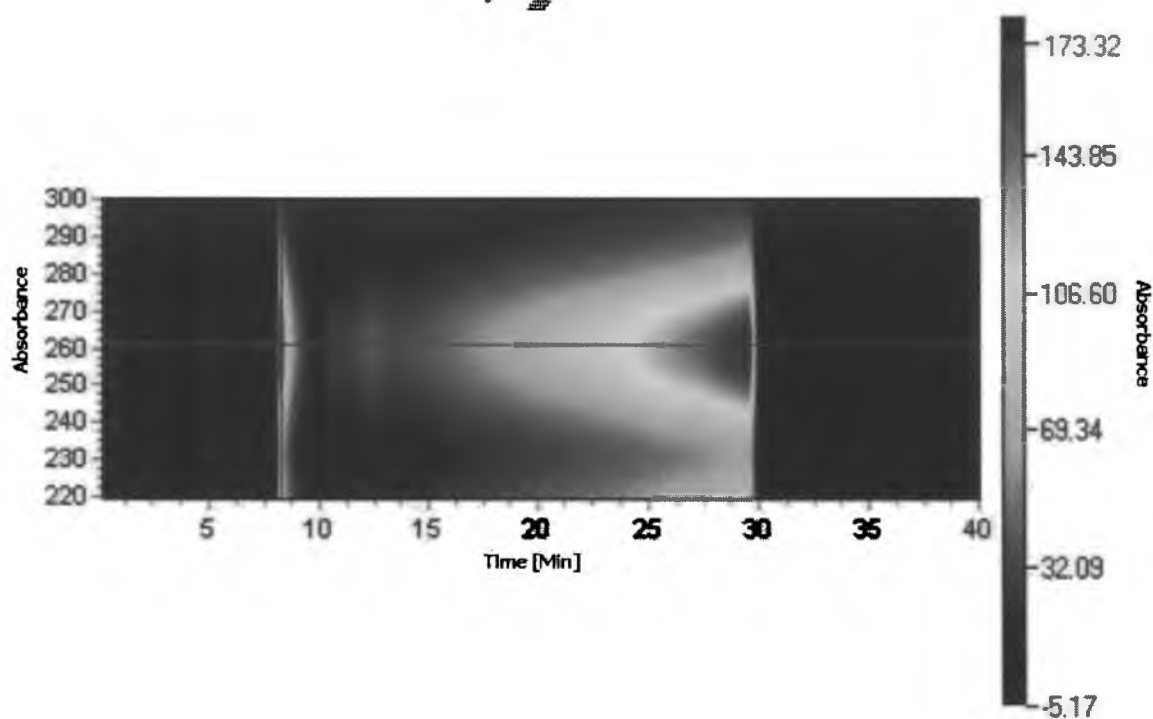


Fig. 4b.

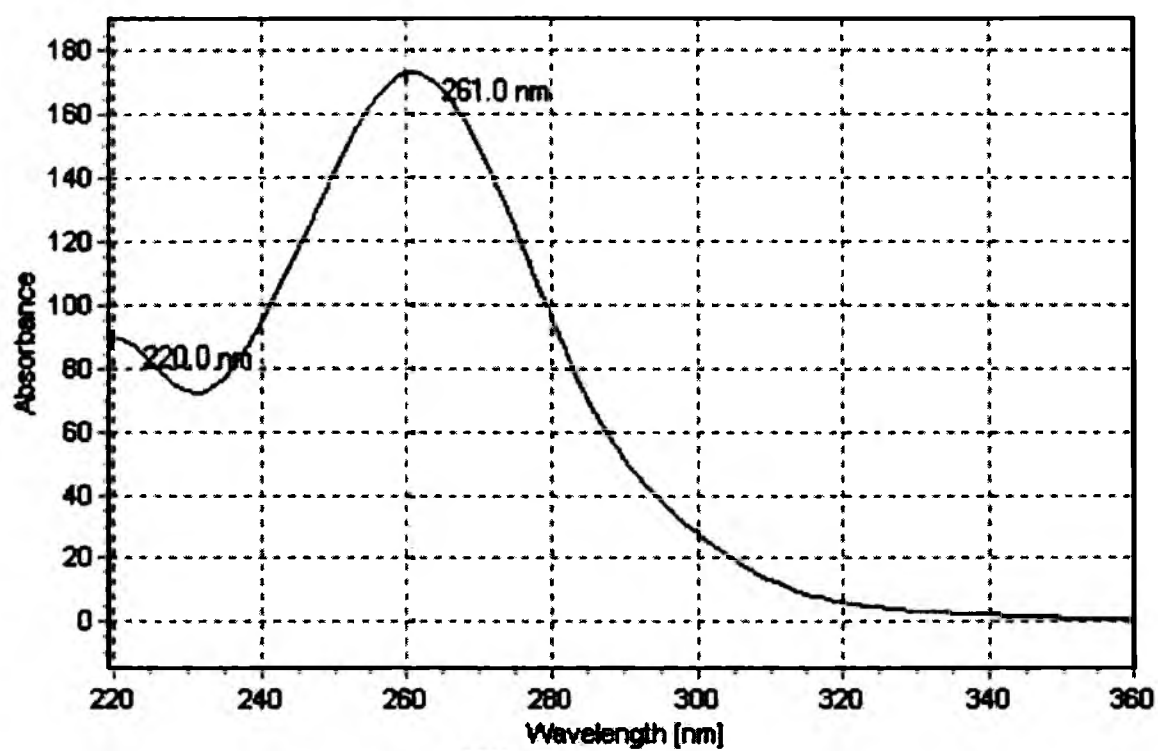


Fig. 4c.

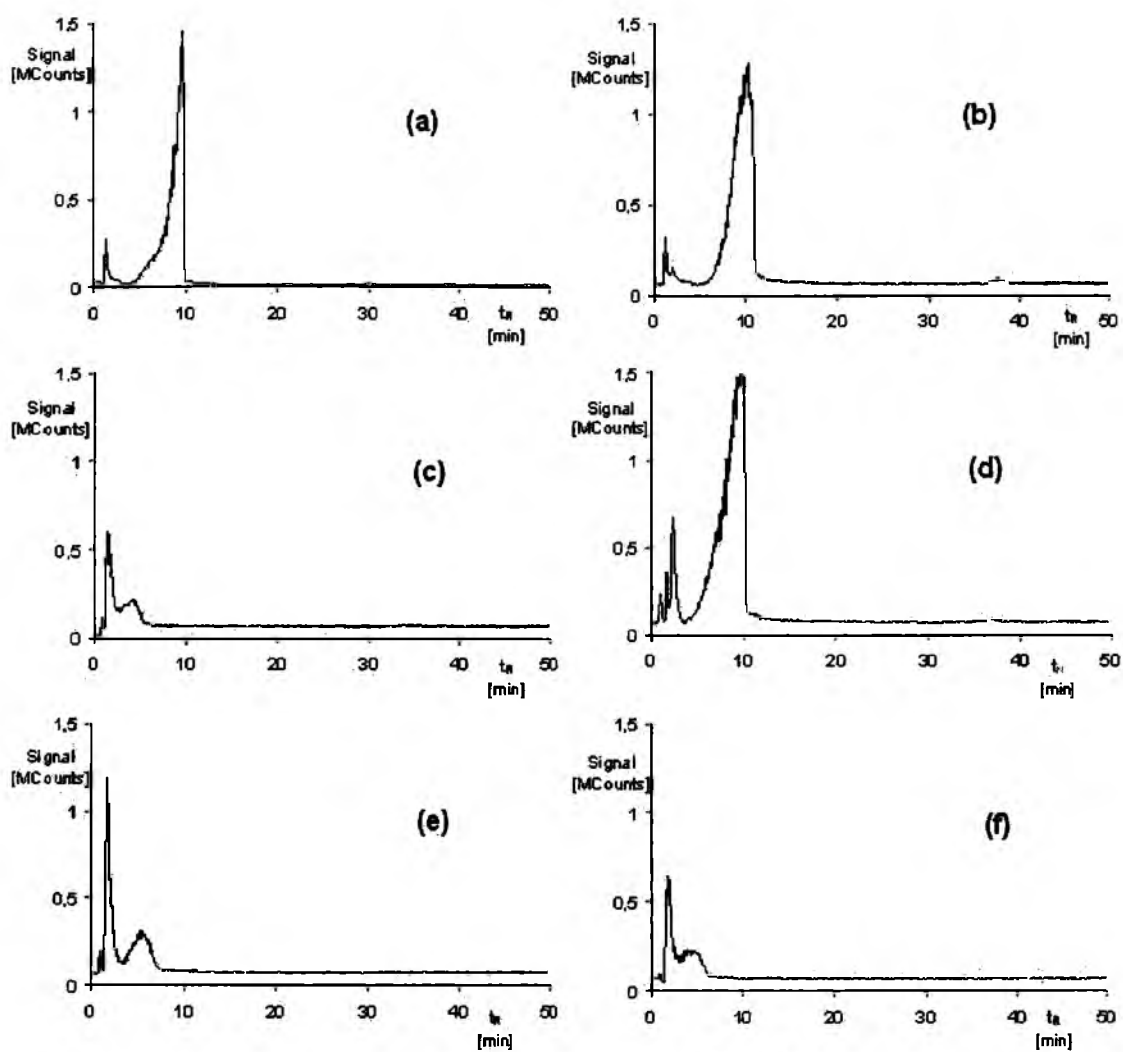


Fig. 5.

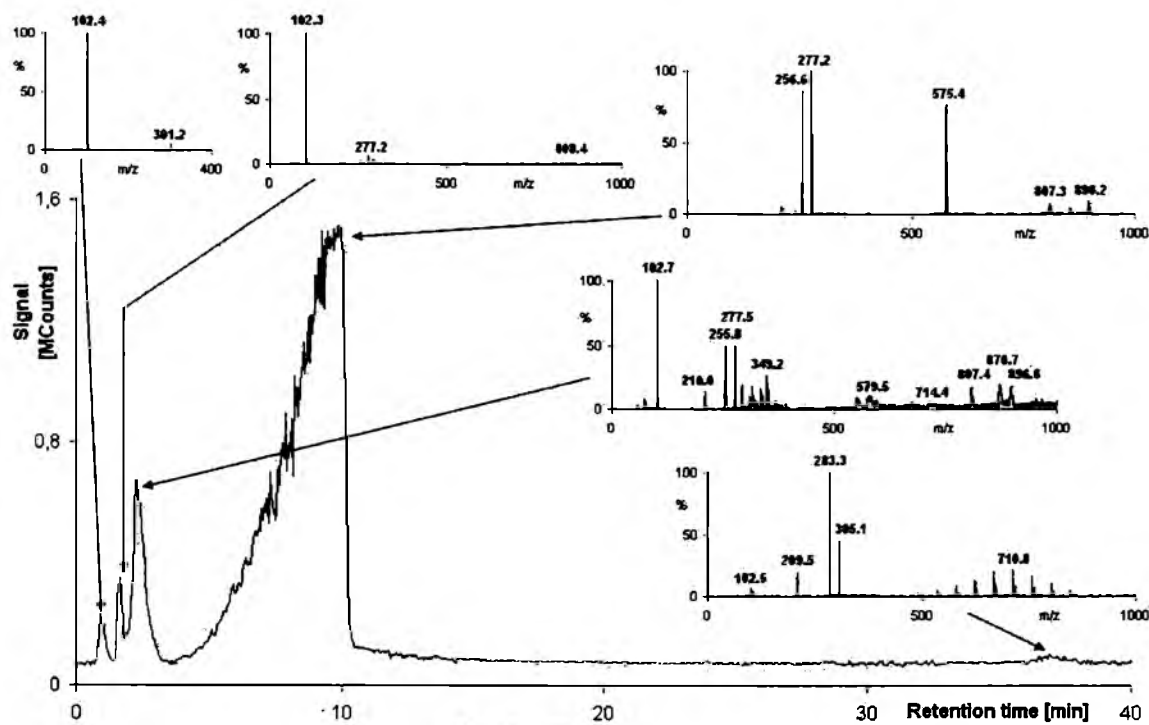


Fig. 6a.

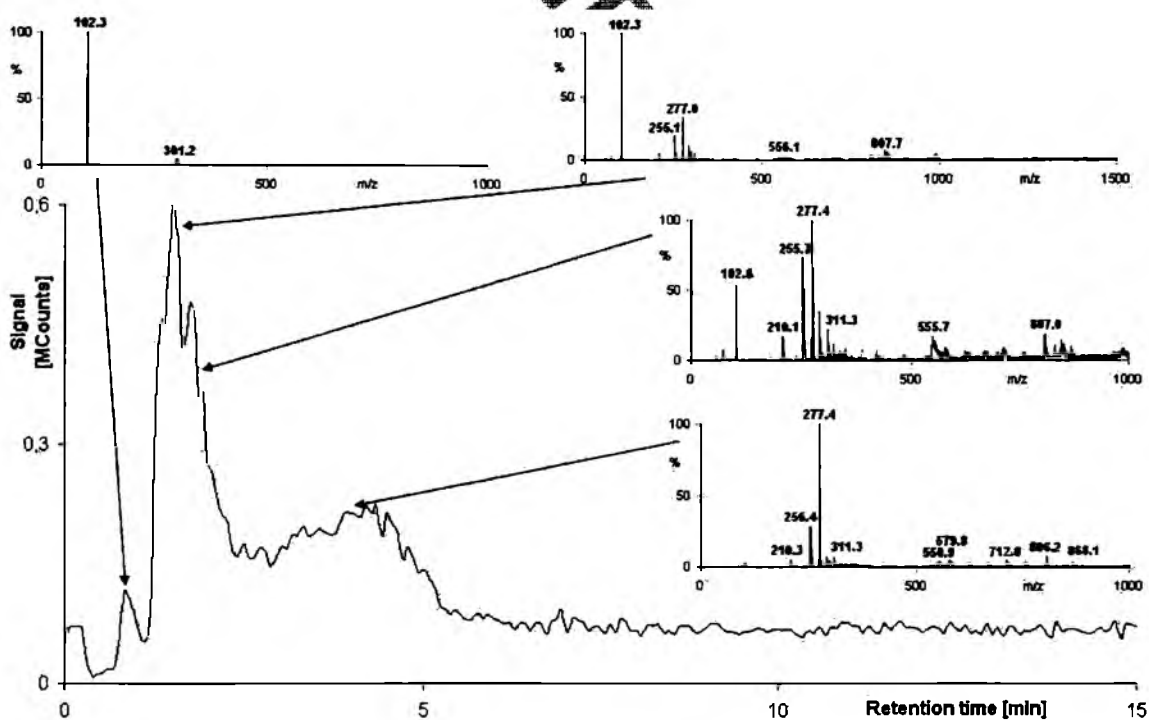


Fig. 6b.

Jak wynika z Tabeli 10, możliwe było jedynie półilościowe oszacowanie stężeń ketoprofenu w odpowiednich warstwach, a to ze względu na zbyt małą objętość próbki, a więc i obu warstw, dodatkowo skłonnych do mieszania się z utworzeniem emulsji. Oszacowano również proporcje, w jakich dwa antymery istnieją w każdej z warstw, a dokonano tego wykorzystując fakt, iż *R*-(-)-ketoprofen migruje wolniej niż *S*-(+)-ketoprofen w zastosowanym układzie chromatograficznym. Tak więc wartości liczbowe zamieszczone w Tabeli 10 powinny być traktowane w sposób półilościowy, głównie ze względu na lepkość badanego roztworu, co czyni go trudnym do aplikacji na płytkę chromatograficzną. Stężenie ketoprofenu w dolnej warstwie było prawie 2,5 raza większe niż w górnej warstwie, co więcej, warstwa dolna zawierała przeważającą ilość *R*-(-)-ketoprofenu. Widać to dobrze na Rys. 89 w postaci dwóch widocznych pasm chromatograficznych w przypadku górnej warstwy (Rys. 89a) i jednego dominującego pasma chromatograficznego przy niższej wartości R_F w przypadku dolnej warstwy (Rys. 89b). Wartości współczynnika retardacji dobrze korespondują z wartościami R_F otrzymanymi podczas eksperymentu 26-dniowego.

Każdą z warstw badanego etanolowo-wodnego roztworu *R,S*-(±)-ketoprofenu poddano również pomiarom mikroskopowym. W obu przypadkach zaobserwowano tworzenie się przestrzennych struktur przypominających te, o których wzmiankowano w publikacjach dotyczących reakcji oscylacyjnych [248,249]. Obserwowane struktury zaprezentowano na Rys. 90 w postaci zdjęć wykonanych przy pomocy mikroskopu.

- [120] E. J. Ebberts, G. J. A. Ariaans, A. Bruggink, B. Zwanenburg, *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 3701 (1999)
- [121] X. Yuan, J. Li, Y. Tian, G.-H. Lee, X.-M. Peng, R. Zhu, X. You, *Tetrahedron: Asymmetry*, **12**, 3015 (2001)
- [122] T. Bando, Y. Namba, K. Shishido, *Tetrahedron: Asymmetry*, **8**, 2159 (1997)
- [123] Z. Jedliński, *Academia*, **2**, 36 (2006)
- [124] A. Gallardo, C. Parejo, J. San Román, *J. Control. Release*, **71**, 127-140 (2001)
- [125] C. Simó, A. Gallardo, C. Parejo, J. San Román, C. Barbas, A. Cifuetes, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **16**, 75-82 (2002)
- [126] R. Bhushan, V. Parshad, *J. Chromatogr. A*, **721**, 369 (1996)
- [127] G. Subramanian, „Chiral Separation Techniques. A Practical Approach”, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007
- [128] M. Sajewicz, R. Piętka, T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC*, **17**, 173 (2004)
- [129] M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **15**, 131 (2005)
- [130] M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, T. Kowalska, *J. Chromatogr. Sci.*, **43**, 542 (2005)
- [131] M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **29**, 2059 (2006)
- [132] M. Sajewicz, R. Piętka, G. Drabik, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **29**, 2071 (2006)
- [133] M. Sajewicz, R. Piętka, P. Kuś, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **16**, 181 (2006)
- [134] R. Piętka, „Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej oraz innych instrumentalnych technik analitycznych do badania reakcji oscylacyjnych wybranych kwasów 2-arylopropionowych”, praca doktorska, Uniwersytet Śląski, Katowice, 2007
- [135] P. Belanger, J. G. Atkinson, R. S. Stuart, *J. Chem. Soc. D: Chem. Commun.*, 1067 (1969)
- [136] J. McMurry, „Chemia organiczna”, PWN, Warszawa, 2003
- [137] R. Międzybrodzki, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **58**, 438 (2004)
- [138] United States Patent No. 4,111,980
- [139] United States Patent No. 4,183,909
- [140] S. D. Jones, J. W. Liebeschuetz, P. J. Morgan, C. W. Murray, A. D. Rimmer, J. M. E. Roscoe, B. Waszkowycz, P. M. Welsh, W. A. Wylie, S. C. Young, H. Martin, J. Mahler, L. Brady, K. Wilkinson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 733 (2001)
- [141] H.-P. Wang, Y.-H. Chuang, C.-Y. Lee, C.-L. Wang, W.-H. Hsieh, *J. Food Drug Anal.*, **14**, 225 (2006)